

**Aktivatoren der Ubiquitin-Ligase APC/C:
Mechanismen und Regulation im Zellteilungszyklus
von *S. cerevisiae***



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Sebastian Höckner

aus Aachen

im Juli 2016

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 01. Juli 2016

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	8
2	Abstract.....	10
3	Einleitung	12
3.1	Der eukaryotische Zellteilungszyklus	12
3.2	Die Regulation des eukaryotischen Zellteilungszyklus.....	15
3.2.1	Regulation des Zellteilungszyklus durch Cdk-vermittelte Phosphorylierung	16
3.2.2	Regulation des Zellteilungszyklus durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse.....	20
3.3	Der APC/C und die Regulation des Zellteilungszyklus	23
3.3.1	Funktionen des APC/C im Zellteilungszyklus	24
3.3.2	Aufbau und Struktur des APC/C und der Aktivatoren	26
3.3.3	Substraterkennung und Aktivierung des APC/C	28
3.3.4	Regulation der APC/C-Aktivität im Zellzyklus	32
3.3.4.1	Regulation der APC/C-Aktivität durch Transkription und Ubiquitin-vermittelte Proteolyse.....	32
3.3.4.2	Regulation der APC/C-Aktivität durch Cdk-Phosphorylierung	34
3.3.4.3	Regulation der APC/C-Aktivität durch Pseudo-Substrat-Inhibitoren	37
4	Ergebnisse	40
4.1	Regulation von Cdh1 durch die N-terminale Domäne	41
4.1.1	Die N-terminale Domäne von Cdh1 ist hinreichend für Zellzyklus-regulierte Lokalisation im Zellkern	41
4.1.2	Die N-terminale Domäne von Cdh1 enthält eine Zellzyklus-regulierte Kernlokalisationssequenz (NLS)	46
4.1.3	Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 steuern die Kernlokalisation von Cdh1.....	52
4.1.4	Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 kontrollieren die Bindung von Cdh1 an den APC/C.....	58
4.2	Regulation von Cdc20 durch APC/C-Cdh1 vermittelte Instabilität	69
4.2.1	Die N-terminalen 80 Aminosäuren von Cdc20 sind hinreichend für Kernlokalisation und APC/C-Cdh1-abhängige Instabilität in der G1-Phase	69
4.2.2	Eine D-Box und eine NLS sind essentielle Bestandteile des Cdc20(1-80)-Degrons	75

4.2.3 Das Cdc20(1-80)-Degron ist im Nukleoplasma maximal instabil	81
4.2.4 Die Instabilität des Cdc20(1-80)-Degrons könnte durch Cdk1-Phosphorylierung reguliert sein	85
4.3 Beitrag der N-terminalen Domäne von Cdc20 zur APC/C-Aktivierung.....	89
4.3.1 Die Überexpression der NTD von Cdc20 hemmt das Zellwachstum.....	89
4.3.1.1 Die anhaltende Überexpression der NTD von Cdc20 verringert die Proteinlevel des S-Phase Cyclins Clb5	91
4.3.1.2 Die Entfernung von RxxL1 schwächt den Wachstum-hemmenden Effekt der NTD von Cdc20 ab.....	94
4.3.2 Die Rolle der RxxL-Motive in Cdc20 für die Aktivator-Funktion.....	97
4.3.2.1 Die Mutation der RxxL-Motive in Cdc20 zeigt einen synthetischen Effekt mit der Deletion des IR-Motivs.....	97
4.3.2.2 Die RxxL-Motive von Cdc20 spielen für die Aktivierung des APC/C eine untergeordnete Rolle.....	102
4.4 Die Rolle der WD40-Domänen für die Spezifität der APC/C-Aktivatoren.....	104
4.4.1 Aktivator-Derivate benötigen die WD40-Domäne von Cdc20 für die Komplementation von <i>cdc20Δ</i>	105
4.4.2 Die Aktivator-Chimäre N1mpWD20 ist ein konstitutiv aktives Cdc20-Derivat	110
4.4.3 Aminosäuren im Bereich des KEN-Box-Rezeptors und der A-Motiv-Bindestelle tragen zur Spezifität der Aktivatoren bei.....	116
5 Diskussion.....	123
5.1 Separate Cdk-Phosphorylierungsstellen steuern die Lokalisation und APC/C-Bindung von Cdh1	123
5.1.1 Die Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 kontrollieren die Lokalisation von Cdh1 im Zellkern	124
5.1.2 Die Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 kontrollieren die Bindung von Cdh1 an den APC/C	129
5.2 Eine D-Box und eine NLS sind essentielle Bestandteile des Cdc20-Degrons für Cdh1-abhängige Degradation	132
5.3 Die APC/C-Cdh1-abhängige Degradation ist auf den Zellkern beschränkt.....	136

5.4 Die Aktivatoren besitzen multiple Interaktionsmotive zur Bindung und Aktivierung des APC/C	138
5.5 Die WD40-Domänen von Cdc20 und Cdh1 unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität	141
6 Material und Methoden.....	148
6.1 Konstruktion der Hefestämme.....	148
6.1.1 Herstellung von Hefestämmen mittels Transformation	149
6.1.1.1 Herstellung von Stämmen mit stabiler Integration von Plasmid-DNA und Überprüfung der Integrationszahl	149
6.1.1.2 Herstellung von Stämmen mit stabiler Integration von Plasmid-DNA in einfacher Kopie.....	151
6.1.2 Herstellung von Hefestämmen durch gezielte Kreuzung und Sporulation	152
6.1.2.1 Kreuzung haploider Hefestämme.....	152
6.1.2.2 Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse.....	152
6.1.3 Konservierung von Hefestämmen	154
6.2. Herstellung der DNA-Konstrukte	154
6.2.1. Präparation von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	155
6.2.2 Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels PCR für die Klonierung	156
6.2.3 Klonierung.....	157
6.2.3.1 Restriktionsverdau von DNA	157
6.2.3.2 Gelelektrophorese von DNA.....	157
6.2.3.3 Ligation von DNA-Molekülen	158
6.2.3.4 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	158
6.2.3.5 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	159
6.2.4 Gezielte Manipulation von Gensequenzen.....	159
6.3 Kultivierung und Synchronisation von Hefekulturen in Flüssigmedium	161
6.4 Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen	163
6.4.1 Präparation und Mikroskopie der Zellen	163
6.4.2 Bildbearbeitung und Quantifizierung der Mikroskopie-Daten	164
6.5. Proteinanalytische Methoden.....	165

6.5.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten	165
6.5.2 Co-Immunpräzipitation	166
6.5.3 Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen	167
6.6 Messung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie	169
6.7 Wachstumstest von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihe	170
6.8 WD40-Spezifitäts-Screen	170
6.8.1 Zufallsmutagenese der WD40-Domäne von N20WD1 mittels <i>error prone PCR</i>	170
6.8.2 Identifizierung von N20WD1-Mutanten mit Cdc20-Spezifität	172
6.9 Bioinformatische Analysen und Modellierung der WD40-Domäne	173
7 Literaturverzeichnis	174
8 Anhang	190
8.1 Ergänzende Abbildungen	190
8.2 Ergänzende Tabellen.....	213
9 Verzeichnisse	228
9.1 Abbildungsverzeichnis	228
9.2 Tabellenverzeichnis.....	231
9.3 Abkürzungsverzeichnis.....	231
10 Lebenslauf	234
11 Danksagung	235

1 ZUSAMMENFASSUNG

Der APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) ist eine konservierte E3-Ubiquitin-Ligase mit essentiellen Funktionen in der Kontrolle des eukaryotischen Zellteilungszyklus. Die Ubiquitinierung von Substraten durch den APC/C erfordert die Bindung von Aktivator-Proteinen, die den APC/C in einer Substrat-spezifischen Weise und zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Zellzyklus aktivieren. Der frühe Aktivator Cdc20 bindet den APC/C in der Metaphase und initiiert durch die Ubiquitinierung von Securin und der Cycline die Trennung der Schwester-Chromatiden sowie die Inaktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks). Am Ende der Mitose wird Cdc20 durch den späten Aktivator Cdh1 ersetzt, der die Degradation der Cycline bis in die G1-Phase aufrecht erhält und durch Ubiquitinierung zahlreicher Mitose-Proteine den Austritt aus der Mitose unterstützt. Die Aktivatoren sind durch eine WD40-Domäne charakterisiert, die konservierte Rezeptorstellen für die Bindung von Substrat-spezifischen Sequenzmotiven, wie die D- oder die KEN-Box, enthält. Dennoch unterscheiden sich die Aktivatoren aus noch unvollständig verstandenen Gründen in ihrer Substratspezifität. Um eine geordnete Degradation der APC/C-Substrate zu gewährleisten, wird die Bindung der Aktivatoren an den APC/C durch multiple Mechanismen reguliert, zu denen die APC/C-Cdh1-vermittelte Degradation von Cdc20 und die inhibitorische Phosphorylierung von Cdh1 durch Cdks zählen. Cdh1 wird an zahlreichen Positionen phosphoryliert, doch die Notwendigkeit und der präzise Wirkmechanismus dieser multiplen Phosphorylierung wurden noch nicht im Detail geklärt.

Um die Regulation der Aktivatoren im Zellteilungszyklus von *S. cerevisiae* besser zu verstehen, wurden die Rolle individueller Cdk-Phosphorylierungsstellen für die Inhibition von Cdh1 analysiert sowie die minimale Abbausequenz (Degron) für die Cdh1-vermittelte Proteolyse von Cdc20 charakterisiert. Zudem wurde die Aktivierung des APC/C durch die N-terminale Domäne von Cdc20 und die Ursache für die unterschiedliche Substratspezifität der Aktivatoren untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die N-terminalen Cdk-Phosphorylierungsstellen von Cdh1 in zwei autonome Subgruppen unterteilen lassen, welche die Interaktion von Cdh1 mit dem APC/C auf unterschiedliche Weise regulieren. Die Phosphorylierung der Cdk-Konsensussequenzen 1-3 inaktiviert eine bipartite Kernlokalisationssequenz (NLS) und verhindert die Akkumulation von Cdh1 im Zellkern. Die übrigen sechs Phosphorylierungsstellen haben keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Cdh1, sondern

beeinträchtigen nach Phosphorylierung spezifisch die Bindung an den APC/C. Die Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 befinden sich in der Nähe von kürzlich identifizierten APC/C-Bindemotiven in einer Anordnung, die in humanem Cdh1 konserviert ist. Sowohl die Inaktivierung der NLS als auch die Inhibition der APC/C-Bindemotive sind für die negative Regulation von Cdh1 durch Cdk1-Phosphorylierung von Bedeutung. Dies deutet an, dass APC/C-Cdh1 im Zellkern aktiv ist.

Diese Schlussfolgerung konnte an Hand der Kartierung des Degrons von Cdc20 für die APC/C-Cdh1-vermittelte Degradation untermauert werden. Das Cdc20-Degron umfasst die N-terminalen 80 Aminosäuren des Proteins und dient als autonome Degradationsdomäne für eine APC/C-Cdh1-spezifische Proteolyse *in vivo*. Neben einer D-Box als APC/C-Erkennungssignal ist eine NLS ein essentieller Bestandteil des Degrons. In der Tat ist die Lokalisation des Cdc20-Degrons im Zellkern eine wichtige Voraussetzung für dessen APC/C-Cdh1-vermittelte Proteolyse. Durch eine gezielte Lokalisierung des Degrons in verschiedenen Zellkompartimenten konnte belegt werden, dass die Aktivität von APC/C-Cdh1 auf den Zellkern beschränkt ist. Zudem wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Erkennung des Cdc20-Degrons durch APC/C-Cdh1 durch eine Cdk-Phosphorylierungsstelle in der Nähe der D-Box reguliert sein könnte.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die N-terminale Domäne von Cdc20 hinreichend ist, um den APC/C zu aktivieren. Dabei stellte sich heraus, dass die D-Box von Cdc20 nicht nur die Degradation des Aktivators vermittelt, sondern auch eine Rolle für die Aktivierung des APC/C spielt. Die Entfernung der D-Box wirkte sich jedoch nur auf die Cdc20-Funktion aus, wenn die Fähigkeit zur Bindung des APC/C bereits beeinträchtigt war, sodass die D-Box möglicherweise der Feinjustierung der APC/C-Cdc20-Interaktion dient.

Die Analyse von Chimären aus Cdc20 und Cdh1 zeigte, dass die N-terminalen Domänen austauschbare Regulations- und Aktivierungselemente sind und die Substratspezifität der Aktivatoren durch die C-terminalen WD40-Domänen festgelegt wird. Mit Hilfe eines genetischen Screens wurden Bereiche in der WD40-Domäne von Cdh1 identifiziert, die zu der Diskriminierung zwischen Cdc20- und Cdh1-Substraten beitragen und spezifisch die Erkennung des Cdc20-Substrats Pds1 betreffen. Dies lässt vermuten, dass die Aktivatoren zusätzlich zu der Bindung von D- und KEN-Boxen individuelle Interaktionen mit ihren Substraten eingehen.

2 ABSTRACT

The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is a conserved E3 ubiquitin ligase that has essential functions in the control of the eukaryotic cell division cycle. Substrate ubiquitination by the APC/C depends on related activator proteins that bind the APC/C at different times during the cell cycle and activate the ubiquitin ligase towards distinct sets of substrates. The early activator Cdc20 binds the APC/C in metaphase and initiates sister-chromatid separation and inactivation of cyclin-dependent kinases (Cdks) by ubiquitination of securin and cyclins, respectively. At the end of mitosis, Cdc20 is replaced by the late activator Cdh1, which facilitates mitotic exit by targeting several mitotic proteins for degradation and maintains the destruction of cyclins during the following G1 phase. Cdc20 and Cdh1 are characterized by WD40 domains that carry conserved receptor sites to recognize specific sequence motifs in substrates, such as D- and KEN-boxes. However, for reasons that are still incompletely understood, Cdc20 and Cdh1 confer different substrate specificities to the APC/C. Multiple mechanisms control the binding of the activators to the APC/C, including APC/C-Cdh1-mediated proteolysis of Cdc20 and inhibitory phosphorylation of Cdh1 by Cdks, to ensure ordered degradation of APC/C substrates. Cdh1 is known to be phosphorylated at numerous Cdk sites, but the requirement and the precise mechanism of this multisite phosphorylation have remained unclear. This study analyzed the role of individual Cdk sites for negative control of Cdh1 and characterized the minimal degradation sequence (degron) of Cdc20 for Cdh1-mediated proteolysis to better understand the regulation of Cdc20 and Cdh1 in the cell division cycle of *S. cerevisiae*. In addition, APC/C activation by the N-terminal domain of Cdc20 and the molecular basis of the distinct substrate specificities of the activators were examined.

This work revealed that the N-terminal Cdk phosphorylation sites of Cdh1 are organized in autonomous subgroups that regulate the interaction of Cdh1 with the APC/C by distinct mechanisms. Phosphorylation of Cdk sites 1-3 inactivates a bipartite nuclear localization sequence (NLS) and prevents accumulation of Cdh1 in the nucleus. In contrast, the remaining six Cdk phosphorylation sites do not influence the subcellular localization of Cdh1, but their phosphorylation specifically inhibits the binding of Cdh1 to the APC/C. Cdk sites 4 – 9 reside in close proximity to recently identified APC/C interaction motifs in a pattern conserved with the human Cdh1 ortholog. Both inactivation of the NLS and inhibition of the

APC/C interaction motifs are important for negative control of Cdh1 by Cdk1 phosphorylation, indicating that APC/C-Cdh1 is active in the nucleus.

This finding received further support by the characterization of the Cdc20-degron for APC/C-Cdh1-mediated proteolysis. The degron of Cdc20 comprises the N-terminal 80 residues of the activator and serves as an autonomous degradation domain for APC/C-Cdh1-specific *in vivo* degradation. In addition to a single D-box as APC/C recognition signal, an NLS was identified as an essential part of the degron. Indeed, localization of the Cdc20 degron in the nucleus is an important prerequisite for its APC/C-Cdh1-mediated proteolysis. Forced localization of the degron into different subcellular compartments revealed that the activity of APC/C-Cdh1 is confined to the nuclear compartment. Moreover, this work suggests that a Cdk site adjacent to the D-box may regulate the recognition of the Cdc20 degron by APC/C-Cdh1.

Furthermore, this study shows that the N-terminal domain of Cdc20 is sufficient to activate the APC/C. Interestingly, besides targeting Cdc20 for Cdh1-mediated degradation, the D-box was also found to play a role in activation of the APC/C. Deletion of the D-box only affected Cdc20 function when the ability of Cdc20 to bind the APC/C was already reduced, suggesting that the D-box may be involved in the fine-tuning of the APC/C-Cdc20 interaction.

Analysis of Cdc20-Cdh1 chimeras revealed that the N-terminal segments of the activators are interchangeable regulatory and APC/C activation domains, while the C-terminal WD40 domains determine the substrate specificities of the activators. A genetic screen identified residues within the WD40 domain of Cdh1 that contribute to the discrimination between Cdc20 and Cdh1 substrates and specifically affected the recognition of the Cdc20 substrate Pds1. This suggests that the activators contain individual binding sites in their WD40 domains, in addition to the conserved D- and KEN-box receptors, for selective binding of substrates.

3 EINLEITUNG

Der mitotische Zellteilungszyklus dient der Vermehrung von Zellen und seine essentiellen Aufgaben umfassen insbesondere die Verdopplung des genetischen Materials und dessen gleichmäßige Aufteilung auf die neu entstehenden Tochterzellen. Der fehlerfreie Ablauf dieser Prozesse wird durch das Zellzykluskontrollsystem überwacht. Auch wenn im Detail kleine Unterschiede zwischen den verschiedenen Organismen bestehen, sind der Ablauf und die Regulation des eukaryotischen Zellteilungszyklus grundsätzlich konserviert (Morgan, 2007). Der APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) ist eine konservierte Ubiquitin-Ligase und übernimmt wichtige Funktionen in der Zellzykluskontrolle. In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der Regulation und Substraterkennung des APC/C und seiner Aktivatoren in *S. cerevisiae* untersucht. Daher liegt in den nachfolgenden Kapiteln neben der allgemeinen Vorstellung des Zellzyklus und seiner Regulation ein besonderer Fokus auf der Situation in *S. cerevisiae*.

3.1 Der eukaryotische Zellteilungszyklus

Der mitotische Zellteilungszyklus der Eukaryoten lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen (Morgan, 2007). In der S-Phase (*S*ynthese-Phase) werden die im Zellkern befindlichen Chromosomen, die das genetische Material in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA, *d*eoxyribonucleic *a*cid) enthalten, zusammen mit den übrigen Zellbestandteilen dupliziert (Bell und Dutta, 2002). Nach der S-Phase bestehen die Chromosomen aus zwei identischen Chromatiden, den Schwester-Chromatiden, die durch Kohäsion-Proteinkomplexe miteinander verbunden sind. Während der M-Phase (*M*itose-Phase) werden die Schwester-Chromatiden auf die entstehenden Tochterzellen aufgeteilt, sodass nach erfolgter Zellteilung zwei genetisch identische Zellen vorliegen (Mitchison und Salmon, 2001). Die Mitose gliedert sich in mehrere Subphasen, in denen die Chromosomentrennung vorbereitet und durchgeführt wird. In der Prophase kondensieren die Chromosomen zu kompakten Strukturen, um eine räumliche Trennung der langen Makromoleküle zu ermöglichen. Zudem beginnt sich die Mitosespindel aus speziellen Proteinfilamenten (Mikrotubuli) zwischen den beiden Zentrosomen auszubilden, die während der S-Phase durch Duplikation entstanden sind und die Pole der Mitosespindel bilden. In höheren Eukaryoten löst sich zu diesem Zeitpunkt die Kernhülle auf. In der

Metaphase verbinden sich die kondensierten Chromosomen bipolar mit der Mitosespindel, sodass die beiden Schwester-Chromatiden mit den entgegengesetzten Polen der Spindel verknüpft sind. Die Trennung der Chromosomen erfolgt während der anschließenden Anaphase, in der die Schwester-Chromatiden nach Spaltung der Kohäsionverbindung zu den entgegengesetzten Polen der Mitosespindel gezogen werden. In der Telophase löst sich die Mitosespindel auf, die Kernhülle bildet sich in höheren Eukaryoten neu und die Chromosomen dekondensieren. Nach der Mitose wird die Zelle in der abschließenden Zytokinese in zwei Zellen geteilt, wobei die Teilungsachse zwischen den neu entstandenen Zellkernen verläuft (Pollard, 2010). In Zellen, die sich permanent teilen, wechseln sich S- und M-Phase zyklisch ab. Dabei sind die beiden Phasen in der Regel durch Zwischenphasen, sogenannte *gap*-Phasen, voneinander getrennt. Die Zwischenphase vor der S-Phase wird als G1 und die Phase vor der M-Phase als G2 bezeichnet. Die *gap*-Phasen dienen einerseits dem Wachstum der Zellen und werden andererseits durch das Zellzykluskontrollsystem (Kapitel 3.2) genutzt, um den Zellzyklus bei Bedarf anzuhalten. Auf äußere Einflussgrößen wie extrazelluläre Signale oder Nährstoffbedingungen kann die Zelle dabei speziell in der G1-Phase reagieren und längere Zeit in dieser Phase verharren. Daher wird die G1-Phase als eine Art Ruhephase zwischen zwei Zellteilungsrounden angesehen, auch wenn es sich um eine aktive Phase handelt, in welcher Zellwachstum stattfindet.

Eine Besonderheit im Zellteilungszyklus der Hefe *S. cerevisiae* ist die Vermehrung durch Knospung, die eine asymmetrische Zellteilung mit der Entstehung von zwei ungleich großen Zellen zur Folge hat (Abb. 3.1; Herskowitz, 1988; Forsburg und Nurse, 1991). Der Eintritt in die S-Phase wird zellmorphologisch von der Ausbildung einer Knospe gekennzeichnet, die durch eine Re-Organisation des Aktin-Zytoskeletts und polares Wachstum entsteht. Der Ort der Knospungsstelle wird durch sogenannte *landmark*-Proteine festgelegt, wodurch unter anderem Septine als Gerüstproteine rekrutiert werden (Casamayor und Snyder, 2002; Park und Bi, 2007). Die Septine bilden eine ringartige Filamentstruktur an der künftigen Verbindungsstelle zwischen der Mutterzelle und der entstehenden Knospe, dem Knospenhals, und erfüllen wichtige Aufgaben in der Organisation des Knospenwachstums, der Kernteilung und Zytokinese (Versele und Thorner, 2005; Cao *et al.*, 2009). In *S. cerevisiae* lässt sich die G2-Phase weniger klar definieren als in anderen Eukaryoten, sodass vielmehr ein fließender Übergang zwischen S- und M-Phase besteht.

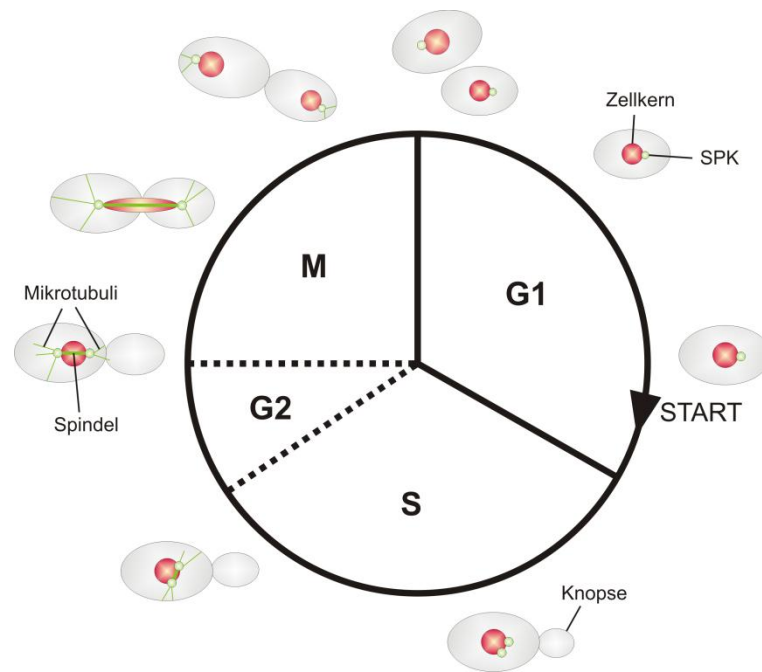


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Zellteilungszyklus von *S. cerevisiae*

Der Kreis symbolisiert einen Zellteilungszyklus bestehend aus der G1-, S-, G2- und M-Phase. Da die G2-Phase in *S. cerevisiae* nicht klar definiert werden kann, sind die entsprechenden Phasengrenzen als gestrichelte Linien gezeichnet. Nach dem Überwinden des START am Ende der G1-Phase tritt die Zelle in die S-Phase ein, um ihr Genom zu duplizieren. Zellmorphologisch äußert sich der Eintritt in die S-Phase durch die Bildung einer Knospe, die zunächst apikales Wachstum zeigt. Zudem verdoppelt sich der Spindelpolkkörper (SPK). Am Ende der S-Phase wird in *S. cerevisiae* bereits eine Spindel zwischen den SPKs gebildet, die durch astrale Mikrotubuli ausgerichtet wird. Zu Beginn der M-Phase befinden sich die SPKs an gegenüberliegenden Polen des Zellkerns und die Mitosespindel ist vollständig ausgebildet. *S. cerevisiae* durchläuft eine geschlossene Mitose, bei der sich die Kernhülle nicht auflöst. Somit elongiert der Zellkern während der Chromosomentrennung, bei der jeweils eines der Schwester-Chromatiden durch den Knospenhals in die Knospe gezogen wird. Nach der Trennung des Zellkerns depolymerisiert die Spindel und die Zellen werden durch die Zytokinese in Mutter- und Tochterzelle getrennt. Verändert nach Höckner, 2011.

Während dieses Übergangs wechselt das Wachstum der Knospe von apikalem zu isotropem Wachstum und setzt sich in der anschließenden Mitose fort. Ein weiteres Merkmal im Zellzyklus von *S. cerevisiae* ist das Durchlaufen einer geschlossenen Mitose, bei der die Kernhülle nicht aufgelöst wird (Boettcher und Barral, 2013). Die Zentrosomen, die in *S. cerevisiae* als Spindelpolkkörper bezeichnet werden, sind in die Kernmembran integriert und bilden die Mitosespindel innerhalb des Zellkerns aus. Während der Mitose elongiert die Spindel durch den Knospenhals und der Zellkern wird zusammen mit einem Satz der duplizierten Chromatiden in die Knospe gezogen. Im Anschluss an die Mitose werden während der Zytokinese eine neue Zellmembran und Zellwand, die ein weiteres Kennzeichen von *S. cerevisiae* ist, am Knospenhals gebildet und die Knospe wird abgetrennt (Cabib, 2004). Da die Knospe im Laufe des Zellzyklus nicht die gleiche Zellgröße der knospenden Zelle

erreicht, werden die ursprüngliche Zelle und die durch Knospung entstandene Zelle als Mutter- bzw. Tochterzelle bezeichnet.

S. cerevisiae-Zellen können zwei verschiedene Paarungstypen aufweisen, *MATa* und *MATα* (Herskowitz, 1988). In Abhängigkeit des Paarungstyps sezernieren haploide Zellen die Signalpeptide a- und α-Faktor, die als Pheromone auf Zellen des jeweils anderen Paarungstyps wirken. Die Paarungspheromone bewirken einen Arrest der haploiden Zellen in der G1-Phase und leiten zelluläre Prozesse ein, die zur Verschmelzung einer *MATa*- und einer *MATα*-Zelle zu einer diploiden Zygote führen. Diploide *MATa/α*-Zellen vermehren sich regulär durch mitotische Zellteilungen. Während haploide Zellen bei Nährstoffmangel in der G1-Phase verharren, sind diploide Zellen in der Lage, durch meiotische Teilungen haploide Sporen als Überdauerungsformen zu bilden (Sporulation).

3.2 Die Regulation des eukaryotischen Zellteilungszyklus

Der Zellteilungszyklus ist eine Abfolge vieler Einzelprozesse, die gemeinsam in der Bildung zweier genetisch identischer Zellen aus einer Vorläuferzelle münden. Im Zellzyklus existieren drei große Kontrollpunkte, die sogenannten *checkpoints*, an denen das Fortschreiten im Zellzyklus angehalten werden kann, wenn vorangegangene Ereignisse nicht fehlerfrei durchlaufen wurden oder äußere Einflüsse ein Unterbrechen des Zellzyklus erfordern (Hartwell und Weinert, 1989). Der Eintritt in die S-Phase wird am G1/S-Übergang durch den Kontrollpunkt START kontrolliert, der nur durchschritten werden kann, wenn externe Faktoren, in *S. cerevisiae* beispielsweise ein ausreichendes Nährstoffangebot und das Fehlen von Paarungspheromonen, sowie interne Faktoren, wie eine ausreichende Zellgröße, dies erlauben. Der nächste wichtige Kontrollpunkt befindet sich vor dem Übergang von der G2- in die M-Phase und ermöglicht ein Anhalten des Zellzyklus, wenn DNA-Schäden oder Replikationsstörungen vorliegen. Dadurch wird der Zelle Zeit gegeben, die Fehler in der DNA zu beheben und die Replikation vollständig abzuschließen. Der letzte große *checkpoint* kontrolliert den Metaphase/Anaphase-Übergang und stellt durch das Spindelkontrollsystem (SAC, *spindle assembly checkpoint*) sicher, dass die Chromosomentrennung nur begonnen wird, wenn alle Schwester-Chromatiden bipolar mit der Mitosespindel verbunden sind. Dadurch wird einer Aneuploidie durch eine fehlerhafte Verteilung der Chromosomen vorgebeugt.

Ein komplexes Geflecht aus regulatorischen Proteinen sorgt dafür, dass die einzelnen Ereignisse des Zellzyklus zur richtigen Zeit gestartet und in der richtigen Reihenfolge durchlaufen werden. Die treibende Kraft sind hierbei die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks, *cyclin-dependent kinases*), die durch Phosphorylierung ihrer Zielproteine einzelne Zellzyklusereignisse in Gang setzen und dadurch den Übergang in die nächste Zellzyklusphase einleiten (Morgan, 1997). Eine weitere, wichtige Komponente des Zellzykluskontrollsystems ist das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), das die Degradation vieler regulatorischer Zellzyklusproteine vermittelt (Teixeira und Reed, 2013). Beide Regulationsmechanismen sind eng miteinander verwoben und beeinflussen sich gegenseitig, da die Aktivität der Cdks einerseits durch die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse der aktivierenden Untereinheiten reguliert wird und die Cdks andererseits durch Phosphorylierung von Substraten oder Komponenten des UPS die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse hemmen oder fördern (Petroski und Deshaies, 2005; Bloom und Cross, 2007; Teixeira und Reed, 2013). Gemeinsam bewirken sie einen geordneten Ablauf der kritischen Ereignisse im Zellzyklus (Pines, 1999; Sullivan und Morgan, 2007).

3.2.1 Regulation des Zellteilungszyklus durch Cdk-vermittelte Phosphorylierung

Die Cdks stehen im Zentrum der Zellzyklusregulation und kontrollieren durch die Phosphorylierung ihrer Zielproteine viele verschiedene Prozesse im Zellzyklus, einschließlich der Zellmorphogenese, der DNA-Replikation, der Chromosomentrennung und des Austritts aus der Mitose (Morgan, 1997; Satyanarayana und Kaldis, 2009; Enserink und Kolodner, 2010). Cdks sind Serin-/Threonin-Kinasen, die Substrate mit der Konsensussequenz S/TPxK/R (mit x als beliebiger Aminosäure) phosphorylieren, wobei die minimale Sequenz S/TP ebenfalls hinreichend für eine Phosphorylierung durch die Cdks ist (Songyang *et al.*, 1994; Mok *et al.*, 2010). Die Aktivität der Cdks ist grundsätzlich abhängig von der Bindung der Cycline, die als regulatorische Untereinheiten sowohl die Aktivität als auch die Substratspezifität der Cdks steuern (Bloom und Cross, 2007; Satyanarayana und Kaldis, 2009). Die Proteinlevel der einzelnen Cycline fluktuieren im Zellzyklus in Form von zeitlich versetzten Wellen, sodass in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedliche Cycline vorhanden sind und mit der katalytischen Untereinheit der Cdks interagieren. Die Cycline unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, die Aktivität der Cdks zu stimulieren, die minimale S/TP-Sequenz zu phosphorylieren und spezifische Bindemotive wie beispielsweise das RxL-

Motiv in den Substraten zu binden, was speziell im Fall von *S. cerevisiae* umfassender untersucht wurde (Loog und Morgan, 2005; Koivomagi *et al.*, 2011a; Koivomagi *et al.*, 2011b). Dies hat zur Folge, dass in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedliche Substrate durch die jeweiligen Cyclin-Cdk-Komplexe phosphoryliert und dadurch unterschiedliche Zellzyklusprozesse in Gang gesetzt werden. Somit koordiniert die Fluktuation der Cyclin-Level den Ablauf des Zellzyklus.

Die Cycline können entsprechend ihres Auftretens und ihrer Funktion für die jeweilige Zellzyklusphase in G1-, G1/S-, S- und M-Phase-Cycline unterteilt werden. Die Oszillation der Cycline basiert vor allem auf Zellzyklus-regulierter Transkription sowie regulierter Degradation durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse. Während der G1-Phase ist die Cyclin-Konzentration und somit die Cdk-Aktivität zunächst niedrig. Die Level der G1-Cycline steigen in Reaktion auf extrazelluläre und intrazelluläre Signale an und leiten den Eintritt in die nächste Zellzyklusrunde ein. Der anschließende, sequentielle Anstieg der G1/S-, S- und M-Phase-Cycline bewirkt den Übergang in die einzelnen Zellzyklusphasen. Dabei ist ein typisches Merkmal, dass die Cyclin-Cdk-Komplexe die Aktivität der Cyclin-Cdk-Komplexe der nachfolgenden Zellzyklusphase fördern und gleichzeitig ihre eigene Inaktivierung verzögert einleiten, indem sie die Degradation der assoziierten Cycline durch das Ubiquitin-Proteasom-System induzieren (siehe Kapitel 3.2.2). Der Austritt aus der M-Phase erfordert neben der Inaktivierung der Cdk's auch die De-Phosphorylierung der Cdk-Substrate durch Phosphatasen, um den Ausgangszustand mit einer geringen Cdk-Aktivität und einem niedrigen Phosphorylierungszustand der Cdk-Substrate in der G1-Phase wiederherzustellen (Wurzenberger und Gerlich, 2011).

Die Aktivierung der Cdk durch die Bindung der Cycline beruht unter anderem auf Konformationsänderungen im aktiven Zentrum der Cdk (Jeffrey *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 2005). Strukturelle Änderungen im sogenannten *T-loop* und der Bindestelle für das Adenosintriphosphat (ATP) machen das aktive Zentrum zugänglich für Substrate und verbessern die Position des ATP für die Phosphorylierungsreaktion. Zusätzlich zu der Bindung der Cycline wird die Aktivität der Cdk's durch Phosphorylierung und Inhibitor-Proteine beeinflusst. Die Phosphorylierung der Cdk durch die Cdk-aktivierende Kinase im *T-loop* wirkt aktivierend und fördert die Bindung des Substrats (Russo *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 2000). Dagegen inhibiert die Phosphorylierung eines konservierten Tyrosinrests im Bereich der ATP-Bindestelle durch die Wee1-Kinase (Swe1 in *S. cerevisiae*) die Aktivität der M-Phase-Cdk's

(Booher *et al.*, 1993; Den Haese *et al.*, 1995). Diese Phosphorylierung muss für den Eintritt in die Mitose durch die antagonistische Phosphatase Cdc25 (Mih1 in *S. cerevisiae*) entfernt werden (Russell *et al.*, 1989; Strausfeld *et al.*, 1991). Während des Austritts aus der Mitose und der anschließenden G1-Phase binden Cdk-Inhibitoren spezifisch an S- und M-Cyclin-Cdk-Komplexe und tragen zusammen mit der Cyclin-Degradation dazu bei, dass die Aktivität dieser Cdk-Komplexe in der G1-Phase niedrig bleibt (Sherr und Roberts, 1999). Die Cdk-Inhibitoren wirken nicht gegen die G1-Cdk-Komplexe und werden beim Übertritt in die S-Phase durch die G1/S-Cdks für den Abbau markiert.

Viele Cdk-Substrate, die an der Regulation des Zellteilungszyklus beteiligt sind, besitzen eine Häufung an Cdk-Phosphorylierungsstellen (Moses *et al.*, 2007; Holt *et al.*, 2008) und für manche dieser Proteine ist die Phosphorylierung an multiplen Positionen eine Voraussetzung für die Ausbildung einer Ultrasensitivität im Umschalten zwischen Aktivitätszuständen und letztlich im Umschalten zwischen Zellzyklusphasen (Salazar und Hofer, 2009; Thomson und Gunawardena, 2009; Ferrell und Ha, 2014). Im Fall der Mitose-Regulatoren Wee1 und Cdc25 sind multiple Phosphorylierungen die Basis für den sprunghaften Anstieg der M-Cdk-Aktivität und den klaren Eintritt in die Mitose (Harvey *et al.*, 2005; Kim und Ferrell, 2007; Harvey *et al.*, 2011; Trunnell *et al.*, 2011). Die multiple Phosphorylierung von Cdk-Substraten wird durch die Interaktion mit *docking sites* (Andockstellen) in den Substraten unterstützt. Diese *docking sites* beinhalten zum einen Cyclin-spezifische Bindemotive und zum anderen Bindestellen für das akzessorische Protein Cks1, das über eine Phosphat-Bindestelle verfügt und für die effiziente Phosphorylierung zahlreicher Cdk-Substrate notwendig ist (Patra *et al.*, 1999; Reynard *et al.*, 2000; Koivomagi *et al.*, 2011a; Koivomagi *et al.*, 2013; McGrath *et al.*, 2013). Arbeiten in *S. cerevisiae* konnten zeigen, dass Cks1 spezifisch an phosphorylierte Threoninreste, aber nicht an phosphorylierte Serinreste oder Phosphat-imitierende Aspartat- oder Glutamatreste bindet (McGrath *et al.*, 2013). Eine weitere, essentielle Anforderung für die Cks1-Bindung ist das Vorhandensein eines Prolins an der Position, die auf das Phospho-Threonin folgt, sodass Cks1 unter anderem an Cdk-Phosphorylierungsstellen mit phosphoryliertem Threoninrest binden kann. Tatsächlich wird Cks1 im Fall des Cdk-Inhibitors Sic1 aus *S. cerevisiae* durch Cdk1 genutzt, um an zuvor selbst phosphorylierte TP-Cdk-Konsensussequenzen zu binden (Koivomagi *et al.*, 2011a; Koivomagi *et al.*, 2013). Diese Cks1-abhängige Interaktion ermöglicht zusammen mit Cyclin-spezifischen Bindemotiven eine gerichtete, prozessive Phosphorylierung von Sic1, die letztlich in der

Phosphorylierung von zwei Abbausignalen und der Degradation von Sic1 resultiert (Koivomagi *et al.*, 2011a).

In *S. cerevisiae* ist eine einzelne Cdk, die als Cdk1 oder Cdc28 bezeichnet wird und mit neun verschiedenen Cyclinen interagiert, verantwortlich für die Regulation des Zellzyklus (Bloom und Cross, 2007; Enserink und Kolodner, 2010). In der G1-Phase wird Cdk1 durch das G1-Cyclin Cln3 aktiviert, dessen Translation bei hoher Proteinsyntheserate ansteigt. Zusammen mit Cln3 startet Cdk1 in erster Linie transkriptionelle Programme für den Zellzykluseintritt und stimuliert unter anderem die Expression der Cyclin-Gene *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* und *CLB6* (Cross und Tinkelenberg, 1991; Dirick und Nasmyth, 1991; Tyers *et al.*, 1993; Stuart und Wittenberg, 1995). Die G1/S-Cycline Cln1 und Cln2 initiieren die Bildung der Knospe und die Duplikation des Spindelpols (Lew und Reed, 1993; Jaspersen *et al.*, 2004). Darüber hinaus unterstützen die G1/S-Cycline zusammen mit Clb5 und Clb6 die Aktivität der nachfolgenden Clb-Cdk1-Komplexe, indem sie die Degradation der Clb-Cycline durch die Ubiquitin-Ligase APC/C-Cdh1 verhindern (siehe Kapitel 3.3.4.2; Zachariae *et al.*, 1998; Yeong *et al.*, 2001) und die Degradation des Cdk-Inhibitors Sic1 vermitteln (Verma *et al.*, 1997; Nash *et al.*, 2001; Koivomagi *et al.*, 2011a), der spezifisch Clb-Cdk1-Komplexe inhibiert (Schwob *et al.*, 1994). Die S-Phase-Cycline Clb5 und Clb6 steuern den Eintritt in die S-Phase und starten unter anderem die Replikation der DNA (Epstein und Cross, 1992; Schwob und Nasmyth, 1993). Vor allem Clb5 ist für eine effiziente DNA-Replikation notwendig und verhindert zusammen mit Clb6 eine erneute Aktivierung von bereits gestarteten Replikationsursprüngen (Dahmann *et al.*, 1995; Donaldson *et al.*, 1998; Mimura *et al.*, 2004). Die M-Phase-Cycline Clb3 und Clb4 akkumulieren ab der S-Phase und sind an der Kontrolle der DNA-Replikation und dem Aufbau der Mitosespindel beteiligt (Richardson *et al.*, 1992; Mendenhall und Hodge, 1998; Liakopoulos *et al.*, 2003). Die Level der M-Cycline Clb1 und Clb2 steigen vor der M-Phase an und steuern kritische Prozesse in der Mitose wie die Elongation der Spindel (Widlund *et al.*, 2006; Woodbury und Morgan, 2007). Zudem induzieren Clb1 und Clb2 den Wechsel von einem apikalen zu einem isotropen Wachstum der Knospe (Lew und Reed, 1993). Auch wenn die einzelnen Cycline nicht essentiell sind und ihre Funktion durch die anderen Cycline übernommen werden können, scheinen vor allem Clb5 und Clb2 von besonderer Bedeutung für die S-Phase und Mitose zu sein. Eine hohe Clb-Cdk1-Aktivität verhindert den Austritt aus der Mitose und die anschließende Zytokinese, sodass für den Abschluss der Zellteilung die Inaktivierung der mitotischen Cdk1-Aktivität notwendig ist. Dies wird durch die Ubiquitin-

vermittelte Proteolyse der Clb-Cycline (Kapitel 3.2.2 und 3.3) und durch die Akkumulation des Cdk-Inhibitors Sic1 erreicht (Schwab *et al.*, 1994). Beide Mechanismen werden durch die Phosphatase Cdc14 eingeleitet, die während des Zellzyklus im Nukleolus lokalisiert und dort von dem Inhibitor Net1/Cfi1 inaktiv gehalten wird (Visintin *et al.*, 1999). Während der Anaphase führen die Signalwege FEAR (*cdc-fourteen early anaphase release*) und MEN (*mitotic exit network*) zu einer Phosphorylierung von sowohl Net1 als auch Cdc14 und bewirken dadurch die Freisetzung von Cdc14 (Stegmeier und Amon, 2004; Rock und Amon, 2009). Die freigesetzte Cdc14-Phosphatase aktiviert durch De-Phosphorylierung des APC/C-Aktivatoren Cdh1 die Degradation der M-Phase-Cycline durch das Ubiquitin-Proteasom-System (siehe auch Kapitel 3.2.2 und Kapitel 3.3) und stimuliert durch die De-Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Swi5 die Expression des Cdk-Inhibitor-Gens *SIC1* (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999). Cdc14 unterstützt die Akkumulation von Sic1 zusätzlich durch De-Phosphorylierung des Cdk-Inhibitors, der dadurch stabilisiert wird und verbliebene Clb-Cdk1-Komplexe inhibieren kann (Visintin *et al.*, 1998). Darüber hinaus entfernt Cdc14 die Phosphorylierung von weiteren Cdk1-Substraten sowie Komponenten des MEN-Signalwegs, wodurch die Freisetzung von Cdc14 gestoppt wird und die Phosphatase in den Nukleolus zurückkehrt (Pereira *et al.*, 2002; Visintin *et al.*, 2008). Neben Sic1 existiert in *S. cerevisiae* noch ein weiterer Cdk-Inhibitor, Far1, der spezifisch Cln-Cdk1-Komplexe inhibiert und in haploiden Zellen den Eintritt in die nächste Zellzyklusrunde verhindert, wenn die Paarungspheromone an die Oberflächenrezeptoren der Zellen gebunden haben (Chang und Herskowitz, 1990; Peter und Herskowitz, 1994).

3.2.2 Regulation des Zellteilungszyklus durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse

Neben der Phosphorylierung durch die Cdk's ist die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von Zellzyklusproteinen ein weiterer, zentraler Mechanismus in der Kontrolle des Zellzyklus (Teixeira und Reed, 2013). Das UPS ist unter anderem für die gerichtete Degradation der Cycline verantwortlich und trägt damit maßgeblich zu der Fluktuation der Cdk-Aktivität bei. Das UPS basiert auf dem kleinen und hoch konservierten Protein Ubiquitin, das über eine Isopeptidbindung kovalent an einen Lysinrest eines Zielproteins geknüpft werden kann (Hershko und Ciechanover, 1998). Der Transfer von Ubiquitin auf andere Proteine wird als Ubiquitinierung bezeichnet und stellt eine Form der posttranslationalen Modifikation von Proteinen dar. Dabei können Proteine an einem einzelnen Lysinrest (Monoubiquitinierung)

oder an mehreren Lysinresten (Multi-Monoubiquitinierung) modifiziert werden. Durch das Anheften weiterer Ubiquitin-Moleküle an bereits gebundenes Ubiquitin können zudem Ubiquitin-Ketten an dem Zielprotein gebildet werden (Poly-Ubiquitinierung). Je nach Anzahl der Ubiquitinmoleküle und Art der Verknüpfung beeinflusst die Ubiquitinierung die Aktivität, Lokalisation und Stabilität des Proteins. In der Regel dienen Ubiquitin-Ketten, die über das Lysin 48 oder Lysin 11 der Ubiquitin-Monomere gebildet werden, als Signal für die Erkennung und Degradation des Zielproteins durch einen Multiproteinkomplex mit proteolytischer Aktivität, der als Proteasom bekannt ist (Tomko und Hochstrasser, 2013).

Die Übertragung von Ubiquitin-Einheiten auf die Zielproteine erfolgt über eine Enzymkaskade bestehend aus drei Enzymen (Abb. 3.2). In einem ersten Schritt wird das Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) gebunden und dadurch für die weitere Reaktion aktiviert. Dieser Prozess erfordert die Hydrolyse von ATP und führt zur Bildung einer Thioester-Bindung zwischen einem Cysteinrest im aktiven Zentrum des E1-Enzyms und der C-terminalen Carboxylgruppe des Ubiquitins. Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin von dem E1-Enzym auf einen Cysteinrest des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Der finale Transfer des Ubiquitins auf einen Lysinrest des Zielproteins wird durch die Ubiquitin-Ligase (E3-Ligase) katalysiert, die sowohl das Substrat als auch das E2-Ubiquitin-Konjugat bindet. Im Fall der Ubiquitin-Ligasen mit HECT-Domäne wird das Ubiquitin zunächst kovalent durch einen Cysteinrest der E3-Ligase gebunden und anschließend auf einen Lysinrest des Substrats übertragen (Rotin und Kumar, 2009). Dagegen katalysieren die Ubiquitin-Ligasen vom RING-Typ den direkten Transfer des Ubiquitins von dem E2-Enzym auf das Substrat, indem sie beide Reaktionspartner für die Ubiquitin-Übertragung optimal orientieren und die Aktivität des E2-Enzyms stimulieren (Deshaies und Joazeiro, 2009). Die E3-Ligasen sind in der Lage, Zielproteine selektiv zu binden, und sind daher für die Substratspezifität in der Ubiquitinierungsreaktion verantwortlich. Die Ubiquitinierung von Proteinen kann durch Ubiquitin-Isopeptidasen, die auch als De-Ubiquitinasen bezeichnet werden, editiert oder rückgängig gemacht werden, wodurch die Ubiquitinierung zu einem reversiblen Prozess wird (Amerik und Hochstrasser, 2004; Stegmeier *et al.*, 2007). Die De-Ubiquitinasen werden insbesondere auch für die Rückgewinnung von Ubiquitin-Molekülen nach der Degradation der Zielproteine durch das Proteasom und für die Prozessierung von Ubiquitin-Vorläufermolekülen benötigt.

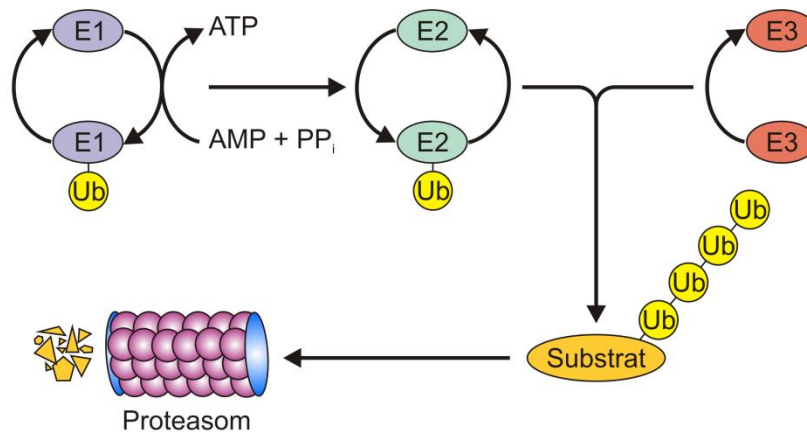


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Substrate können mittels Ubiquitinierung für die Degradation durch das Proteasom markiert werden. Für die Ubiquitinierung eines Substrats wird Ubiquitin unter ATP-Hydrolyse kovalent an einen Cysteinrest des E1-Enzyms (Ubiquitin-aktivierendes Enzym) gebunden. Das Ubiquitin wird anschließend auf einen Cysteinrest E2-Enzym (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) übertragen. Mit Hilfe einer E3-Ligase erfolgt schließlich der Transfer von Ubiquitin auf einen Lysinrest des Substrats. Durch Verknüpfung weiterer Ubiquitin-Moleküle an einen Lysinrest des bereits übertragenen Ubiquitins werden Ubiquitinketten an dem Substrat gebildet. Ketten aus mindestens vier Ubiquitin-Molekülen, die über Lys11 oder Lys48 des Ubiquitins verknüpft wurden, dienen als Signal für die Erkennung und anschließende Proteolyse des Substrats durch das Proteasom. ATP: Adenosintriophosphat. AMP: Adenosinmonophosphat. PP_i : anorganisches Diphosphat. Ub: Ubiquitin. Adaptiert von Pines, 2011.

In der Kontrolle des Zellzyklus nehmen vor allem die Ubiquitin-Ligasen SCF (Skp-Cullin-F-Box) und der APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) zentrale Rollen ein (Teixeira und Reed, 2013). In beiden Fällen handelt es sich um Multiproteinkomplexe, die zu der Familie der Cullin-RING-Ubiquitin-Ligasen zählen. In diesem Typ von Ubiquitin-Ligasen rekrutiert das Protein mit RING-Domäne das mit Ubiquitin beladene E2-Enzym, während die Cullin-Untereinheit als Gerüstprotein fungiert. Neben dem RING-Protein Rbx1 und dem Cullin-Protein Cul1 (Cdc53 in *S. cerevisiae*) enthält der SCF als weitere zentrale Komponente das Skp1-Protein (Cardozo und Pagano, 2004). Skp1 interagiert mit verschiedenen F-Box-Proteinen, die als austauschbare Adaptorproteine selektiv Substrate an den SCF rekrutieren (Skaar *et al.*, 2013). Die F-Box-Proteine nutzen eine konservierte F-Box zur Bindung an Skp1 und interagieren über spezielle Interaktionsdomänen mit verschiedenen Substraten. Der Zeitpunkt der Substratubiquitinierung wird nicht durch Änderungen in der Aktivität des SCF bestimmt, die im Laufe des Zellzyklus weitgehend konstant ist, sondern wird durch die Phosphorylierung der Substrate festgelegt. Die Phosphorylierung bestimmter Sequenzmotive, sogenannter Phospho-Degrone, erhöht die Affinität der Substrate für das jeweilige F-Box-Protein. Häufig ist die Phosphorylierung durch Cdks der Auslöser für die SCF-

abhängige Ubiquitinierung von Zellzyklusproteinen. Der SCF markiert Cdk-Inhibitoren, G1- und G1/S-Cycline, Replikationsfaktoren und Mitose-Inhibitoren für den Abbau durch das Proteasom und übernimmt somit wichtige Funktionen am G1/S-Übergang, in der S-Phase und am Übergang in die M-Phase. Zu den SCF-Substraten in *S. cerevisiae* zählen unter anderem der Cdk-Inhibitor Sic1, die G1-Cycline Cln1-3, das S-Phase-Cyclin Clb6 und der Replikationsfaktor Cdc6, die alle durch Cdk1-Phosphorylierung für den SCF-vermittelten Abbau markiert werden (Skowyra *et al.*, 1997; Verma *et al.*, 1997; Elsasser *et al.*, 1999; Drury *et al.*, 2000; Perkins *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2006). Vor allem die Cycline Cln1-3 initiieren durch Auto-Phosphorylierung ihre eigene Degradation (Tyers *et al.*, 1992; Lanker *et al.*, 1996).

Während der SCF vor allem die frühen Phasen des Zellteilungszyklus reguliert, steuert der APC/C den Ablauf sowie den Austritt aus der Mitose und unterstützt die Etablierung der G1-Phase (Kapitel 3.3.1). Der APC/C weist einen deutlich komplexeren Aufbau als der SCF auf (Kapitel 3.3.2) und die Ubiquitinierung der APC/C-Substrate ist von der Bindung von Aktivatorproteinen abhängig. Die Aktivatoren rekrutieren einerseits Substrate an den APC/C und stimulieren andererseits die katalytische Aktivität der Ubiquitin-Ligase (Kapitel 3.3.3). Ein komplexes Regulationsnetzwerk regelt die Bindung der Aktivatoren an den APC/C und begrenzt die Ubiquitinierung von APC/C-Substraten zeitlich auf die Mitose und die G1-Phase (Kapitel 3.3.4).

3.3 Der APC/C und die Regulation des Zellteilungszyklus

Die Ubiquitin-Ligase APC/C ist eine wichtige Komponente des Zellzykluskontrollsystems und steuert die Progression durch die Mitose und die G1-Phase durch die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von kritischen Zellzyklusregulatoren (Primorac und Musacchio, 2013; Sivakumar und Gorbsky, 2015). Der APC/C ist ein Gegenspieler der Cdks, da er unter anderem die M-Phase-Cdk-Komplexe durch Ubiquitinierung der assoziierten Cycline inaktiviert. Auf der anderen Seite unterliegt der APC/C selbst der Regulation durch Cdk-vermittelte Phosphorylierung. Die gegenseitige Regulation von Cdks und APC/C bildet die Grundlage der Zellzykluskontrolle. Darüber hinaus kontrolliert der APC/C den Beginn der Chromosomentrennung, die das zentrale Ereignis der Mitose darstellt.

3.3.1 Funktionen des APC/C im Zellteilungszyklus

Der APC/C markiert während der Mitose und der G1-Phase zahlreiche Zellzyklusproteine durch Ubiquitinierung für den Abbau durch das Proteasom und trägt dadurch maßgeblich zur Kontrolle dieser Zellzyklusphasen bei (Peters, 2006; Pines, 2011). Obwohl der Kernkomplex des APC/C aus zahlreichen Untereinheiten besteht (Kapitel 3.3.2), ist für die Ubiquitinierung von APC/C-Substraten die Bindung von Aktivatorproteinen an den APC/C erforderlich. Im mitotischen Zellteilungszyklus binden zwei verschiedene Aktivatoren an den APC/C. Der frühe Aktivator Cdc20 aktiviert den APC/C in der Mitose und wird gegen Ende der Mitose durch den späten Aktivator Cdh1, auch bekannt als Hct1, ersetzt (Hartwell *et al.*, 1973; Dawson *et al.*, 1995; Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998). Cdh1 hält die APC/C-Aktivität bis in die G1-Phase aufrecht (Huang *et al.*, 2001). Neben diesen mitotischen APC/C-Aktivatoren konnten mit Ama1 in *S. cerevisiae*, Mrf1 in *S. pombe* sowie Cort und Fzr2 in *D. melanogaster* noch weitere, Meiose-spezifische Aktivatoren in manchen Organismen identifiziert werden (Pesin und Orr-Weaver, 2008).

Cdc20 bindet den APC/C in der frühen Mitose und der APC/C-Cdc20-Komplex erfüllt zwei zentrale Aufgaben am Übergang von der Metaphase in die Anaphase. Zum einen fördert APC/C-Cdc20 die Trennung der Schwester-Chromatiden, indem APC/C-Cdc20 den Anaphase-Inhibitor Securin (Pds1 in *S. cerevisiae*) für den Abbau durch das Proteasom markiert (Cohen-Fix *et al.*, 1996; Waizenegger *et al.*, 2000; Zur und Brandeis, 2001). Securin bindet eine Protease namens Separase (kodiert durch *ESP1* in *S. cerevisiae*) und inhibiert deren proteolytische Aktivität (Ciosk *et al.*, 1998). Durch den Abbau von Securin wird Separase aktiviert und kann anschließend die Kohäsion zwischen den Schwester-Chromatiden spalten, wodurch deren Trennung in der Anaphase erleichtert wird (Uhlmann *et al.*, 1999; Oliveira und Nasmyth, 2010). In *S. cerevisiae* unterstützt die Aktivierung der Separase zudem die Freisetzung der Phosphatase Cdc14 über das FEAR-Netzwerk, wodurch der Austritt aus der Mitose gefördert wird (Kapitel 3.2.1, Rock und Amon, 2009). Zum anderen initiiert APC/C-Cdc20 die Inaktivierung der Cdks durch Ubiquitinierung der S- und M-Phase-Cycline (Clute und Pines, 1999; Shirayama *et al.*, 1999; Yeong *et al.*, 2000; Wäsch und Cross, 2002). Die Cdc20-vermittelte Reduktion der Cdk-Aktivität erleichtert die Aktivierung der Separase und ist die Voraussetzung für den späteren Austritt aus der Mitose. In *S. cerevisiae* ist Cdc20 vor allem für die Degradation des S-Phase-Cyclins Clb5 verantwortlich und trägt nur geringfügig zur Degradation des M-Phase-Cyclins Clb2 bei,

dessen Stabilität stärker durch den späten Aktivator Cdh1 beeinflusst wird (Schwab *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1997; Yeong *et al.*, 2000; Schwab *et al.*, 2001; Wäsch und Cross, 2002; Lu *et al.*, 2014). Weitere, gut untersuchte Substrate von APC/C-Cdc20 sind die mitotische Kinase Nek2A in höheren Eukaryoten (Hayes *et al.*, 2006; Sedgwick *et al.*, 2013) sowie das Spindelmotorprotein Kip1 (Gordon und Roof, 2001), die regulatorische Untereinheit Dbf4 der S-Phase-Kinase Cdc7 (Ferreira *et al.*, 2000) und der Cdh1-Inhibitor Acn1 in *S. cerevisiae* (Enquist-Newman *et al.*, 2008). Die Cdc20-abhängige Degradation von Acn1 unterstützt vermutlich den Wechsel der Aktivatoren am Ende der Mitose (Kapitel 3.3.4.3).

In der späten Mitose bindet der späte Aktivator Cdh1 den APC/C und fördert den Austritt aus der Mitose. APC/C-Cdh1 setzt die Degradation der Cycline und damit die Inaktivierung der Cdk's fort (King *et al.*, 1995; Schwab *et al.*, 1997; Geley *et al.*, 2001). Darüber hinaus vermittelt APC/C-Cdh1 den Abbau weiterer mitotischer Kinasen wie der Polo- und Aurora-Kinasen (Charles *et al.*, 1998; Honda *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2002; Littlepage und Ruderman, 2002; Lindon und Pines, 2004; Nguyen *et al.*, 2005). Ein weiteres Substrat von APC/C-Cdh1 ist der frühe Aktivator Cdc20, dessen Cdh1-vermittelte Ubiquitinierung zur Inaktivierung der APC/C-Cdc20-Isoform beiträgt (Kapitel 3.3.4.1). In *S. cerevisiae* unterstützt APC/C-Cdh1 den Abbau der Mitosespindel durch Ubiquitinierung der Spindel-Regulatoren Cin8 (Hildebrandt und Hoyt, 2001) und Ase1 (Juang *et al.*, 1997) und markiert die Knospenhalsproteine Hsl1 (Burton und Solomon, 2000) und Iqg1 (Ko *et al.*, 2007) für den Abbau. Während in *S. cerevisiae* die Degradation der Cycline ausreichend ist, um die Bildung von Prä-Replikationskomplexen für die DNA-Replikation in der nächsten S-Phase zu ermöglichen, muss in höheren Eukaryoten zusätzlich Geminin durch APC/C-Cdh1 ubiquitiniert werden (McGarry und Kirschner, 1998; Zielke *et al.*, 2008). Nach dem Austritt aus der Mitose ist die primäre Funktion von APC/C-Cdh1 in der G1-Phase, die Proteinlevel von S- und M-Phase-Cyclinen gering zu halten, um eine stabile G1-Phase mit niedriger Cdk-Aktivität zu etablieren und einen frühzeitigen Eintritt in die S-Phase zu verhindern. Neben der direkten Wirkung auf die Cycline markiert APC/C-Cdh1 in höheren Eukaryoten zusätzlich das F-Box-Protein Skp2 für den Abbau, um die SCF-abhängige Degradation der Cdk-Inhibitoren p21 und p27 zu verhindern (Bashir *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2004).

3.3.2 Aufbau und Struktur des APC/C und der Aktivatoren

Der APC/C ist eine ungewöhnlich große Ubiquitin-Ligase und setzt sich je nach Organismus aus 13 bis 19 überwiegend konservierten Untereinheiten zusammen, die eine dreieckige Struktur mit einem inneren Hohlraum bilden (Abb. 3.3; Barford, 2011; Chang und Barford, 2014). Die APC/C-Untereinheiten bestehen größtenteils aus strukturellen Motiven wie den PC- (*proteasome/cyclosome*) oder TPR- (*tetratricopeptide repeat*) oder WD40-Motiven. Das Fundament der Struktur wird vorwiegend aus den Untereinheiten Apc4, Apc5 und der größten Untereinheit Apc1 gebildet. Apc1 besitzt unter anderem eine N-terminale WD40-Domäne sowie PC-Motive, wie sie auch in Untereinheiten des Proteasoms zu finden sind, und geht zahlreiche Interaktionen mit anderen APC/C-Untereinheiten ein. Die Rückwand und die Spitze des Komplexes setzt sich aus den Untereinheiten Apc8/Cdc23, Apc6/Cdc16, Apc3/Cdc27 und Apc7 (letztere nicht existent in *S. cerevisiae*) zusammen. Diese Untereinheiten liegen jeweils als V-förmige Homo-Dimere im APC/C vor und sind durch TPR-Motive charakterisiert. Während die N-terminalen Domänen der TPR-Proteine zur Dimerisierung genutzt werden, halten die C-terminalen Domänen Kontaktstellen zur Interaktion mit weiteren Proteinen bereit.

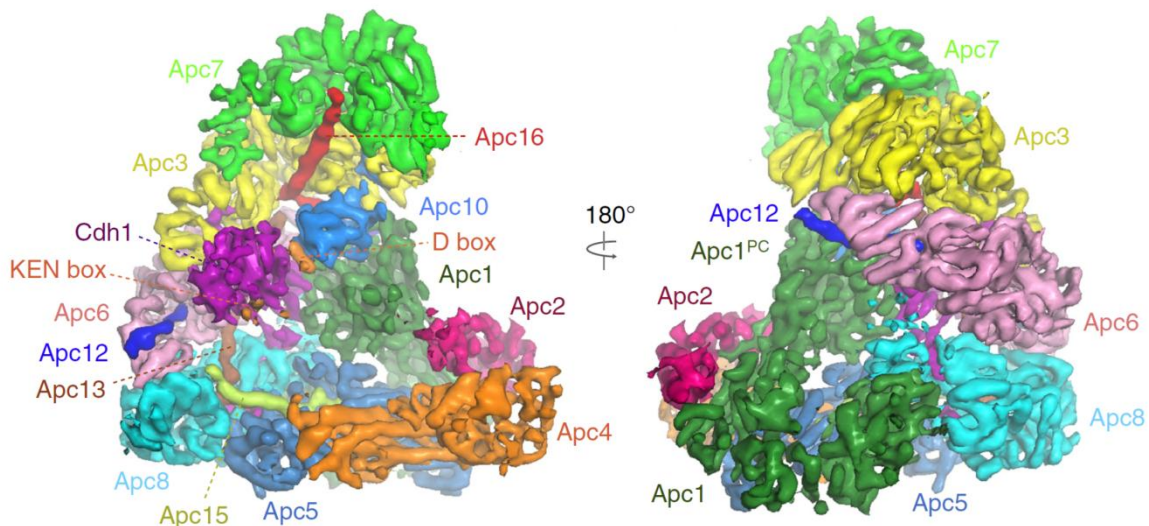


Abbildung 3.3: Elektronenmikroskopie-Rekonstruktionen von humanem APC/C

Struktur des humanen APC/C in Komplex mit dem Aktivator Cdh1 und dem Substrat Hsl1 mit einer Auflösung von 7,4 Å. Die einzelnen Untereinheiten des APC/C sind farb-codiert und der Komplex ist sowohl in der Vorderansicht mit Blick auf den Hohlraum und auf das katalytische Modul (links) als auch in der Rückansicht mit Blick auf den TPR-Subkomplex (rechts) gezeigt. Entnommen aus Chang und Barford, 2014.

Die TPR-Untereinheiten stapeln sich in paralleler Ausrichtung im Komplex und ihre Anordnung wird teilweise durch die Untereinheiten Apc13/Swm1 und Apc16 (nicht existent in *S. cerevisiae*) bzw. Apc9 (nicht existent in *H. sapiens*) stabilisiert. Das katalytische Modul befindet sich vor dem Hohlraum auf der Vorderseite der Plattform und besteht aus dem RING-Fingerprotein Apc11, welches das Ubiquitin-beladene E2-Enzym rekrutiert, und dem Cullin-verwandten Protein Apc2, das Apc11 im APC/C-Komplex verankert. Oberhalb des katalytischen Subkomplexes sind die APC/C-Untereinheit Apc10/Doc1 und der Aktivator lokalisiert, die beide an der Substratbindung beteiligt sind (Kapitel 3.3.3).

Die Aktivatoren des APC/C zeigen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit und zeichnen sich durch eine C-terminale WD40-Domäne aus, die aus sieben WD40-Motiven besteht und eine Propeller-artige Raumstruktur einnimmt (Chao *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013). Die WD40-Domäne besitzt Bindestellen für Sequenzmotive in den Substraten und übernimmt daher eine wichtige Funktion in der Substratbindung (Kapitel 3.3.3). Im Gegensatz zur C-terminalen Domäne (CTD) ist die N-terminale Domäne (NTD) der Aktivatoren unstrukturiert und wenig konserviert (Abb. 8.1 im Anhang). Als charakteristisches Motiv enthält die NTD der Aktivatoren eine C-Box (Schwab *et al.*, 2001), die laut kürzlich veröffentlichter Strukturdaten von humanem APC/C an die APC/C-Untereinheit Apc8/Cdc23 bindet (Chang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Ein weiteres konserviertes Motiv für die Interaktion mit dem APC/C ist das C-terminale IR-Motiv, das sich aus den Aminosäuren Isoleucin und Arginin zusammensetzt und die APC/C-Untereinheit Apc3/Cdc27 kontaktiert (Vodermaier *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Als zusätzliches APC/C-Motiv wurde in humanem Cdc20 das KILR-Motiv identifiziert (Zhang und Lees, 2001; Izawa und Pines, 2012), das gemäß der aktuellen APC/C-Struktur mit Apc8/Cdc23 interagiert und die Konformation der C-Box stabilisiert (Zhang *et al.*, 2016). In humanem Cdh1 findet sich zudem ein KLLR-Motiv, das in der Sequenz dem KILR-Motiv ähnelt, sich jedoch an anderer Position in der NTD befindet und als Teil einer Helix mit der Untereinheit Apc1 interagiert (Chang *et al.*, 2015). Auf Grund ihrer Fähigkeit, sowohl mit dem APC/C als auch mit den Substraten zu interagieren, fungieren die Aktivatoren unter anderem als Adaptorproteine zur Rekrutierung von Substraten an den APC/C.

3.3.3 Substraterkennung und Aktivierung des APC/C

Die Erkennung von Substraten durch den APC/C-Aktivator-Komplex basiert klassischerweise auf kurzen Sequenzmotiven, die in unterschiedlicher Kopienzahl und in verschiedenen Kombinationen in den APC/C-Substraten vorliegen können. Die am meisten verbreiteten und am besten charakterisierten Vertreter dieser Erkennungssignale sind die D-Box (*destruction-box*) mit der Konsensussequenz RxxLxxxxN sowie die KEN-Box, die nach ihrer Konsensussequenz KENxxxN benannt wurde (Glutzer *et al.*, 1991; Pfleger und Kirschner, 2000). Mit Hilfe von Strukturdaten konnten in den letzten Jahren tiefere Einblicke in die Substraterkennung gewonnen und die Bindestellen für die D- und die KEN-Box im APC/C-Aktivator-Komplex identifiziert werden. Die D-Box wird durch einen Co-Rezeptor, bestehend aus der WD40-Domäne des Aktivators und der APC/C-Untereinheit Apc10/Doc1, gebunden (Abb. 3.3; Buschhorn *et al.*, 2011; da Fonseca *et al.*, 2011). Dabei bindet der N-terminale Teil der D-Box einschließlich des konservierten RxxL-Motivs in einer seitlichen Furche zwischen zwei Blättern des WD40-Propellers, während der C-terminale Teil der D-Box mit Apc10/Doc1 interagiert (Abb. 3.4; Carroll *et al.*, 2005; He *et al.*, 2013; Chang und Barford, 2014). Der Rezeptor für die KEN-Box wird ausschließlich durch den Aktivator gebildet und befindet sich auf der Oberseite der WD40-Domäne (Abb. 3.4; Chao *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013). In diversen Substraten wurden noch weitere APC/C-Erkennungssignale gefunden, die zum Teil eine gewisse Ähnlichkeit zu entweder der D- oder der KEN-Box aufweisen und somit degenerierte Varianten dieser Signale darstellen könnten (Pines, 2011). Tatsächlich deuten *in vitro*-Ubiquitinierungsexperimente an, dass diese degenerierten Varianten ebenfalls an die D- und KEN-Box-Rezeptoren der WD40-Domäne binden (He *et al.*, 2013).

Interessanterweise sind die Bindestellen für die D- und KEN-Box in den Aktivator-Orthologen konserviert (Abb. 8.1 im Anhang). Dies spricht gegen die Theorie, dass Cdc20 und Cdh1 unterschiedliche Präferenzen für D- und KEN-Boxen besitzen könnten. Stattdessen legen die Strukturdaten nahe, dass die Bindung der D- und KEN-Box ein grundlegender Schritt in der Erkennung von APC/C-Substraten durch die Aktivatoren ist. Somit ist die molekulare Grundlage für die unterschiedliche Substratspezifität von Cdc20 und Cdh1 (Visintin *et al.*, 1997; Schwab *et al.*, 2001; Wan und Kirschner, 2001) nach wie vor unvollständig verstanden.

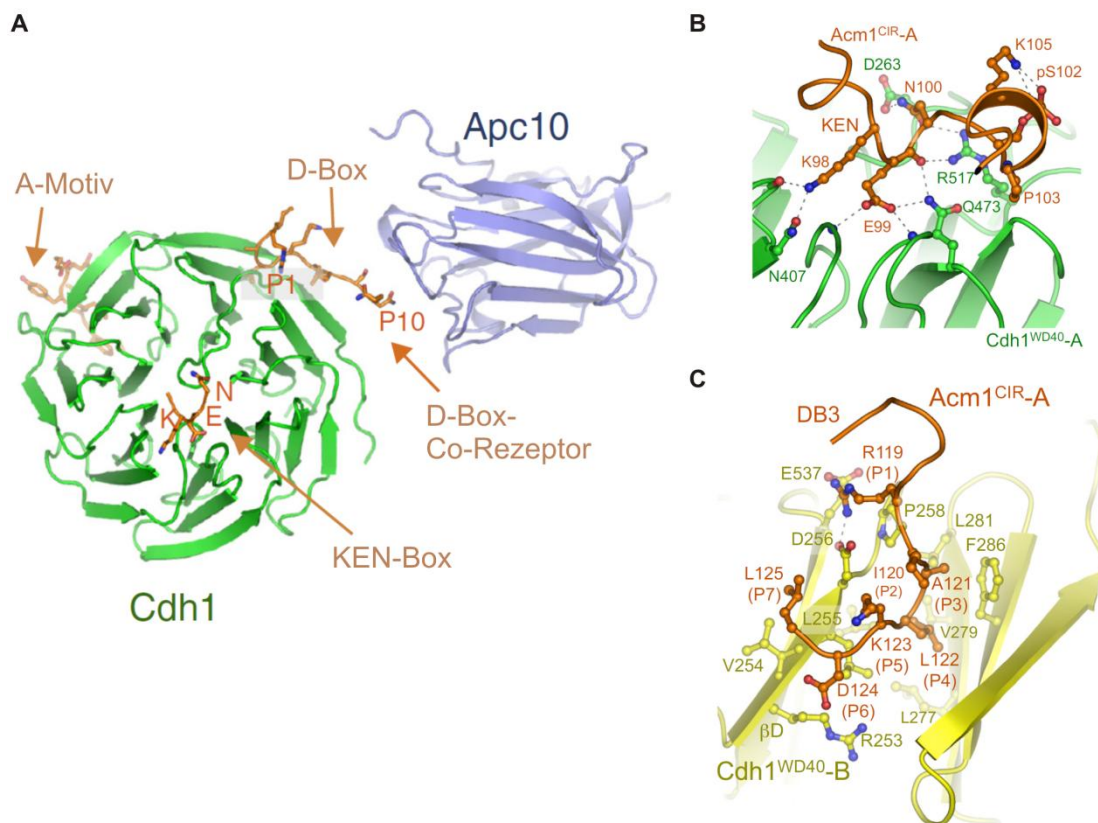


Abbildung 3.4: Bindung der D- und der KEN-Box durch die WD40-Domäne der APC/C-Aktivatoren

(A) Modell der D- und KEN-Box-Erkennung durch Cdh1 und die APC/C-Untereinheit Apc10/Doc1. Die D-Box wird durch einen Co-Rezeptor bestehend aus der WD40-Domäne des Aktivators und Apc10/Doc1 gebunden. Die Positionen 1-7 der D-Box interagieren mit Cdh1 und die Position 8-10 kontaktieren Apc10. Der Rezeptor für die KEN-Box befindet sich auf der Oberseite des WD40-Propellers. Die Bindestelle für das A-Motiv ist ebenfalls gezeigt. Verändert nach Chang und Barford, 2014. (B) Detailansicht der Interaktion der KEN-Box von Acm1 mit dem KEN-Box-Rezeptor von Cdh1. Die Aminosäuren der KEN-Box interagiert mit polaren, konservierten Aminosäuren auf der Oberseite der WD40-Domäne. Entnommen aus He *et al.*, 2013. (C) Detailansicht der Interaktion der D-Box von Acm1 mit der D-Box-Bindestelle von Cdh1. Gezeigt sind die 7 N-terminalen Aminosäuren der D-Box, welche in einer konservierten Furche zwischen den Blättern 1 und 7 des WD40-Propellers des Aktivators binden. Entnommen aus He *et al.*, 2013.

Es wird jedoch vermutet, dass die Substrate weitere Sequenzmotive für die Interaktion mit weniger konservierten Bindestellen nutzen und dadurch selektiv mit Cdc20 oder Cdh1 interagieren können, ähnlich wie es für den Cdh1-Inhibitor Acm1 in *S. cerevisiae* beschrieben wurde (siehe auch Kapitel 3.3.4.3). Acm1 besitzt ein sogenanntes A-Motiv, das die spezifische Bindung an und Inhibition von Cdh1, jedoch nicht Cdc20, ermöglicht (Enquist-Newman *et al.*, 2008; Burton *et al.*, 2011; He *et al.*, 2013). Interessanterweise wurde in den humanen SAC-Proteinen BubRI und Bub1 (siehe Kapitel 3.3.4.3) sowie in humanem Cyclin A und dessen Pendant Clb5 in *S. cerevisiae* kürzlich das ABBA-Motiv (Cyclin A/BubRI/Bub1/Acm1-Motiv) beschrieben, das in Acm1 konserviert zu sein scheint und das

ursprüngliche A-Motiv mit einschließt (Lu *et al.*, 2014; Di Fiore *et al.*, 2015). Das ABBA-Motiv interagiert mit einem Bereich der WD40-Domäne, der zwischen Cdc20 und Cdh1 weniger konserviert ist (He *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014; Di Fiore *et al.*, 2015). Dabei scheinen einzelne Aminosäurepositionen in der ABBA-Bindestelle, in denen Cdc20 und Cdh1 voneinander abweichen, die spezifische Bindung der ABBA-Motive an entweder Cdc20 oder Cdh1 zu bewirken. So wird die Interaktion mit den ABBA-Motiven verhindert, wenn die Aminosäurereste an diesen nicht-konservierten Positionen durch die äquivalenten Aminosäurereste des anderen Aktivators ersetzt werden (He *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014; Di Fiore *et al.*, 2015). Da das ABBA-Motiv von Acm1 darüber hinaus nicht mit humanem Cdc20 interagiert (Di Fiore *et al.*, 2015), setzt sich das ABBA-Motiv offenbar aus einem konservierten Anteil und aus einem Aktivator-spezifischen Anteil zusammen, der die selektive Bindung an Cdc20 oder Cdh1 ermöglicht. Bislang ist unklar, ob noch weitere solcher Aktivator-spezifischen Bindemotive in APC/C-Substraten existieren.

Zusammen mit der unterschiedlichen Substratspezifität der Aktivatoren wird durch die geordnete Bindung von erst Cdc20 und anschließend Cdh1 an den APC/C grundsätzlich die Reihenfolge festgelegt, in der die APC/C-Substrate im Zellzyklus degradiert werden. Auch innerhalb der Cdc20- und Cdh1-Substrate lässt sich eine gewisse Ordnung in der Degradation feststellen (Pines, 2006; Sullivan und Morgan, 2007). Mittlerweile konnten für einige Substrate die zu Grunde liegenden Mechanismen aufgedeckt werden. In Vertebraten sind Cyclin A sowie die Kinase Nek2A in der Lage, Aktivator-unabhängig an den APC/C zu binden. Während Nek2A ein MR-Motiv, das den C-terminalen IR-Motiven der Aktivatoren ähnelt, zur unabhängigen Bindung an den APC/C nutzt (Hayes *et al.*, 2006; Sedgwick *et al.*, 2013), beruht die Aktivator-unabhängige Interaktion von Cyclin A mit dem APC/C auf seinen Bindungspartnern Cdk und Cks1 (Wolthuis *et al.*, 2008; Di Fiore und Pines, 2010). Dies erlaubt die Degradation von Nek2A und Cyclin A in der frühen Mitose, wenn die Degradation von Securin und Cyclin B noch durch den SAC (Kapitel 3.3.4.3) verhindert wird (Geley *et al.*, 2001; Hagting *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2006; Wolthuis *et al.*, 2008; Di Fiore und Pines, 2010). Ein weiterer Mechanismus zur Feinregulation des Abbaubeginns ist die Phosphorylierung der Substrate in der Nähe ihrer APC/C-Erkennungssignale, wodurch die Bindung durch den APC/C-Aktivator-Komplex verhindert wird und der Abbau relativ zu anderen APC/C-Substraten verzögert werden kann (Kapitel 3.3.4.2). Darüber hinaus lässt die Position der Rezeptorstellen auf der WD40-Domäne vermuten, dass im Fall von Substraten

mit D- und KEN-Box eine kooperative Bindung der APC/C-Signale möglich ist, sofern sie sich in der richtigen Orientierung und in einem geeignetem Abstand zueinander befinden (Chao *et al.*, 2012). Somit ist es denkbar, dass Substrate, die sowohl eine D- und eine KEN-Box besitzen, mit höherer Affinität an den APC/C binden als Substrate, die nur eines der Abbausignale enthalten, und dadurch bevorzugt ubiquitiniert werden. Allerdings ließ sich in *in vitro*-Experimenten nicht immer eine Kooperativität zwischen D- und KEN-Boxen beobachten (Chao *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012), sodass die Rolle der kooperativen Bindung von APC/C-Erkennungssignalen für die Effizienz und die zeitliche Kontrolle der Substrat-Ubiquitinierung unklar bleibt. Zusätzlich könnte die Prozessivität der Ubiquitinierung die Reihenfolge der Substratdegradation beeinflussen (Rape *et al.*, 2006). So erfordert die Poly-Ubiquitinierung von Cyclin A eine mehrmalige Bindung des Proteins, wohingegen Securin während eines einzelnen Bindungsereignisses zügig poly-ubiquitiniert wird. Die Prozessivität der Ubiquitinierung ist D-Box-abhängig und Apc10/Doc1 als Bestandteil des Co-Rezeptors spielt hierbei eine wichtige Rolle (Carroll und Morgan, 2002; Passmore *et al.*, 2003; Carroll *et al.*, 2005; Rape *et al.*, 2006; Buschhorn *et al.*, 2011; da Fonseca *et al.*, 2011). In der Tat scheint die D-Box von Cyclin A eine geringere Affinität für den APC/C-Aktivator-Komplex zu besitzen als die D-Box von Securin (Rape *et al.*, 2006).

Die Aktivatoren unterstützen nicht nur die Bindung der Substrate, sondern werden zusätzlich für die katalytische Aktivität des APC/C benötigt. So erfordert die Degradation von Nek2A trotz dessen unabhängiger Bindung an den APC/C die Anwesenheit von Cdc20 (Kimata *et al.*, 2008). Strukturanalysen zeigen, dass die Bindung der Aktivatoren Konformationsänderungen im APC/C-Komplex auslöst und die relative Positionierung der APC/C-Untereinheiten ändert (Dube *et al.*, 2005; Herzog *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014). Speziell der katalytische Subkomplex Apc2-Apc11 wird in Folge der Aktivatorbindung angehoben und gelangt in größere, räumliche Nähe zu der Substratbindestelle, die durch den Aktivator und Apc10/Doc1 gebildet wird. Dadurch wird das Ubiquitin-beladene E2-Enzym vermutlich in eine bessere Position für den Transfer des Ubiquitins auf das Substrat gebracht. Zudem wird durch die Konformationsänderung die Flexibilität des katalytischen Subkomplexes erhöht, wodurch nicht nur die Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat, sondern auch die Rekrutierung von E2-Enzymen erleichtert werden könnte. Tatsächlich erhöht der Aktivator die Affinität des APC/C für das E2-Enzym (Chang *et al.*, 2014; Van Voorhis und Morgan, 2014) und scheint an der Rekrutierung direkt beteiligt zu sein (Kelly *et al.*, 2014).

3.3.4 Regulation der APC/C-Aktivität im Zellzyklus

Für einen fehlerfreien Ablauf des Zellzyklus ist es essentiell, dass die Substrate des APC/C zum richtigen Zeitpunkt degradiert werden (Pines, 2006; Sullivan und Morgan, 2007). Eine Vielzahl von zum Teil redundanten Regulationsmechanismen sorgt dafür, dass Cdc20 und Cdh1 den APC/C nur in ausgewählten Zellzyklusphasen sowie in einer geordneten Reihenfolge aktivieren (Pesin und Orr-Weaver, 2008; Sivakumar und Gorbsky, 2015). Während durch regulierte Transkription und Degradation über das UPS die Verfügbarkeit der Aktivatoren gesteuert wird, wird die Interaktion mit dem APC/C und mit den Substraten durch Phosphorylierung und Inhibitor-Proteine kontrolliert.

3.3.4.1 Regulation der APC/C-Aktivität durch Transkription und Ubiquitin-vermittelte Proteolyse

Im Gegensatz zu Cdh1 fluktuiert die Proteinmenge von Cdc20 stark im Laufe des Zellzyklus (Fang *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 1998; Prinz *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998). Die Verfügbarkeit von Cdc20 wird hierbei maßgeblich durch die Zellzyklus-regulierte Transkription und die hohe Instabilität des Aktivators beeinflusst. In der G1-Phase ist Cdc20 nicht vorhanden und seine Proteinlevel steigen auf Grund von regulierter Expression ab der S-Phase an. Die Regulation der *CDC20*-Transkription ist in *S. cerevisiae* am besten untersucht und erfordert die Aktivität von Cdk1 (Prinz *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2012). Die Expression von *CDC20* wird durch den Transkriptionsrepressor Yox1 unterdrückt. Cdk1 scheint die Expression sowie die Stabilität von Yox1 negativ zu regulieren und dadurch die Transkription von *CDC20* zu fördern (Liang *et al.*, 2012). Yox1 enthält mehrere Cdk-Phosphorylierungsstellen und konnte *in vitro* durch Cdk1 phosphoryliert werden (Ubersax *et al.*, 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass Cdk1 durch die akzessorische Untereinheit Cks1 an die Promotorregion von *CDC20* rekrutiert wird (Morris *et al.*, 2003). Somit könnte Cdk1 durch Phosphorylierung die Entfernung von Yox1 von dem *CDC20*-Promotor bewirken. Allerdings scheint Cdk1 für die Transkription von *CDC20* anschließend wieder von der Promotorregion dissoziieren zu müssen und das Proteasom wird stattdessen an den *CDC20*-Promotor rekrutiert (Morris *et al.*, 2003).

Verschiedene, APC/C-abhängige Mechanismen halten Cdc20 während des gesamten Zellzyklus instabil und wirken der regulierten Transkription von *CDC20* entgegen (Prinz *et al.*, 1998). Zum einen ist Cdc20 ein Substrat des späten Aktivators Cdh1, der Cdc20 zum Ende der

Mitose für den Abbau markiert und eine Re-Akkumulation in der G1-Phase verhindert (Prinz *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998; Pfleger und Kirschner, 2000; Huang *et al.*, 2001; Robbins und Cross, 2010a). Da die Transkription von Cdc20 zu diesem Zeitpunkt vermutlich durch den Repressor Yox1 unterdrückt wird (Liang *et al.*, 2012), führt die Cdh1-vermittelte Degradation während des Mitoseaustritts zu einer raschen Abnahme der Cdc20-Level, nachdem diese in der Anaphase ihr Maximum erreicht haben. Während in Säugerzellen eine KEN- und eine CRY-Box (Konsensus: CRYxPS) als Abbausignale für die Cdh1-abhängige Degradation von Cdc20 dienen (Pfleger und Kirschner, 2000; Reis *et al.*, 2006), basiert der Abbau von Cdc20 aus *S. cerevisiae* auf zwei RxxL-Motiven, die dem minimalen Konsensus der D-Box entsprechen. Allerdings wurde der individuelle Beitrag dieser Motive für die Cdh1-vermittelte Instabilität bislang unterschiedlich bewertet (Prinz *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998; Robbins und Cross, 2010a). Zusätzlich zur Ubiquitinierung als Substrat von Cdh1 wird Cdc20 zum anderen über auto-katalytische Mechanismen für den Abbau markiert. Während der frühen Mitose, wenn Cdc20 in Folge eines aktiven SAC in einem inhibitorischen Komplex vorliegt (Kapitel 3.3.4.3), erfolgt eine kontinuierliche Auto-Ubiquitinierung von Cdc20 mit anschließender Degradation des Aktivators (Foster und Morgan, 2012; Uzunova *et al.*, 2012). Diese auto-katalytische Ubiquitinierung von Cdc20 erfordert die APC/C-Untereinheit Mnd2/Apc15 und soll einerseits die Cdc20-Level niedrig halten, um die Etablierung des SAC-Arrestes zu erleichtern und ein Überlaufen des Arrestes zu verhindern (Pan und Chen, 2004; Nilsson *et al.*, 2008; Foster und Morgan, 2012), und wird andererseits für die Auflösung des inhibitorischen Komplexes nach Inaktivierung des SAC benötigt (Mansfeld *et al.*, 2011; Foster und Morgan, 2012; Uzunova *et al.*, 2012). Eine weitere Form der Auto-Ubiquitinierung von Cdc20 existiert in der Anaphase und erfolgt *in cis*, da für diesen Mechanismus kein weiteres Aktivatormolekül, aber eine intakte C-Box und ein intaktes IR-Motiv notwendig ist (Foe *et al.*, 2011). Die Auto-Ubiquitinierung von Cdc20 in der Anaphase unterstützt vermutlich die Entfernung des Aktivators von dem APC/C-Komplex, nachdem die Cdc20-Substrate degradiert wurden.

Die Proteinmenge von Cdh1 schwankt im Verlauf des Zellzyklus weniger dramatisch als im Fall von Cdc20. Dennoch konnte vor allem in Säugerzellen eine gewisse Abnahme der Cdh1-Level in der G1- und der S-Phase beobachtet werden (Listovsky *et al.*, 2004; Benmaamar und Pagano, 2005; Fukushima *et al.*, 2013). In Säugerzellen scheint Cdh1 während der G1-Phase seine eigene Degradation durch Auto-Ubiquitinierung herbeizuführen (Listovsky *et al.*, 2004).

Darüber hinaus bewirkt die Phosphorylierung von Cdh1 durch Cyclin A-Cdk2 und Plk1 (Kapitel 3.3.4.2) den Abbau von Cdh1 durch die SCF-Ubiquitin-Ligase am G1/S-Übergang (Benmaamar und Pagano, 2005; Fukushima *et al.*, 2013). Eine derartige Regulation scheint in *S. cerevisiae* nur zum Teil zu existieren. So ist die Proteinmenge von phosphoryliertem Cdh1 während der S- und M-Phase höher als die zu detektierende Menge von nicht-phosphoryliertem Cdh1 in der G1-Phase (Zachariae *et al.*, 1998; Jaquenoud *et al.*, 2002). Dies lässt vermuten, dass Cdh1 auch in *S. cerevisiae* während der G1-Phase instabiler als in den übrigen Zellzyklusphasen ist, jedoch scheint der Aktivator durch die Phosphorylierung am G1/S-Übergang, anders als im Säuger-System, stabilisiert zu werden. Ein weiterer Mechanismus zur Inaktivierung von APC/C-Cdh1 durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse in humanen Zellen ist die Auto-Ubiquitinierung des E2-Enzyms UbcH10 durch APC/C-Cdh1, nachdem die Menge der Cdh1-Substrate in der G1-Phase abgenommen hat (Rape und Kirschner, 2004).

3.3.4.2 Regulation der APC/C-Aktivität durch Cdk-Phosphorylierung

In der Regulation der APC/C-Aktivität ist die Phosphorylierung durch Cdks ein zentraler Mechanismus, der die Bindung von Cdc20 und Cdh1 an den APC/C steuert. In der frühen Mitose fördert die Phosphorylierung von APC/C-Untereinheiten durch Cdks und möglicherweise auch durch Plk1 die Bindung von Cdc20 an den APC/C (Shteinberg *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 2000; Rudner und Murray, 2000; Golan *et al.*, 2002; Kraft *et al.*, 2003). Aktuelle Arbeiten konnten den zu Grunde liegenden Mechanismus aufdecken, der vor allem auf der Phosphorylierung von Apc1 beruht (Fujimitsu *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). So bindet eine Schlaufe der WD40-Domäne von Apc1 in nicht-phosphoryliertem Zustand an die C-Box-Bindestelle in Apc8/Cdc23 und blockiert den Zugang für Cdc20 (Zhang *et al.*, 2016). Die Phosphorylierung an mehreren Positionen der Apc1-Schlaufe löst deren Interaktion mit Apc8/Cdc23 auf und gibt die Bindestelle für die C-Box von Cdc20 frei (Fujimitsu *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Dabei wird die Auflösung dieser Auto-Inhibition durch die Phosphorylierung der Untereinheit Apc3/Cdc27 unterstützt. So ermöglicht die Phosphorylierung einer Schlaufe in Apc3/Cdc27 die Rekrutierung von Cyclin-Cdk-Komplexen über das Cks2-Protein und erhöht dadurch die Effizienz der Apc1-Phosphorylierung (Fujimitsu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Laut den kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen bildet die NTD von Cdh1 mehr Kontakte zu APC/C-Untereinheiten aus als die NTD von Cdc20 und die Bindung des IR-Motivs wird im Fall von Cdh1 durch eine assoziierte α -Helix unterstützt, die in Cdc20 fehlt (Chang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Diese Unterschiede resultieren vermutlich in einer höheren Affinität von Cdh1 für den APC/C und könnten erklären, weshalb Cdh1 im Gegensatz zu Cdc20 den APC/C auch in nicht-phosphoryliertem Zustand binden und aktivieren kann (Qiao *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Vermutlich reicht die höhere Affinität von Cdh1 aus, um die auto-inhibitorische Schlaufe von Apc1 von der C-Box-Bindestelle zu verdrängen. Die Interaktion von Cdh1 mit dem APC/C wird dennoch durch Cdk-Phosphorylierung beeinflusst, da die Phosphorylierung von Cdh1 dessen Bindung an den APC/C verhindert (Zachariae *et al.*, 1998; Lukas *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 2000). Die entgegengesetzte Wirkung der Cdk-Phosphorylierung auf die APC/C-Bindung von Cdc20 und Cdh1 hat zur Folge, dass in Zellzyklusphasen mit hoher Cdk-Aktivität nur Cdc20 zur Interaktion mit dem APC/C fähig ist. Erst nachdem APC/C-Cdc20 die Cdk-Aktivität durch Ubiquitinierung der Cycline reduziert hat, kann Cdh1 durch Phosphatasen, wie der Phosphatase Cdc14 in *S. cerevisiae*, de-phosphoryliert werden und den APC/C anschließend binden (Visintin *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999; Wurzenberger und Gerlich, 2011). Somit legt die Cdk-Aktivität die Reihenfolge, in der Cdc20 und Cdh1 den APC/C aktivieren, grundlegend fest.

Ebenso wie seine Orthologen aus anderen Organismen besitzt Cdh1 aus *S. cerevisiae* multiple Cdk-Motive, die entweder der minimalen (S/TP) oder der vollen Konsensussequenz (S/TPxK/R) für die Phosphorylierung durch Cdks entsprechen. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Cdh1 tatsächlich an diesen Cdk-Motiven *in vivo* phosphoryliert wird (Hall *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2009; Swaney *et al.*, 2013). Interessanterweise verhindert die Phosphorylierung von Cdh1 in *S. cerevisiae* nicht nur die APC/C-Bindung (Zachariae *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999), sondern beeinflusst zusätzlich die subzelluläre Lokalisation des Aktivators (Jaquenoud *et al.*, 2002). Während sich nicht-phosphoryliertes Cdh1 im Zellkern befindet, liegt Cdh1 nach Phosphorylierung im Zytoplasma vor. Bislang konnte der APC/C ausschließlich im Zellkern detektiert werden (Zachariae *et al.*, 1996; Jaquenoud *et al.*, 2002; Melloy und Holloway, 2004), sodass die zytoplasmatische Lokalisation von Cdh1 nach Phosphorylierung die Inaktivierung von APC/C-Cdh1 unterstützen könnte. Da die meisten Experimente bislang mit einer Cdh1-Version durchgeführt wurden, der alle Cdk-

Phosphorylierungsstellen fehlen, ist die genaue Bedeutung der einzelnen Cdk-Phosphorylierungsstellen für die APC/C-Bindung und Lokalisation des Aktivators noch unklar. Interessanterweise wird in höheren Eukaryoten auch Cdc20 durch Cdk-Phosphorylierung, insbesondere im Bereich der C-Box, an der Interaktion mit dem APC/C gehindert (Jaspersen *et al.*, 1999; Yudkovsky *et al.*, 2000). Dieser Mechanismus dient vermutlich dazu, die Aktivität von APC/C-Cdc20 vor allem in der Interphase niedrig zu halten, um eine ausreichende Akkumulation der Cycline und dadurch einen robusteren Eintritt in die Mitose zu erreichen (Hein und Nilsson, 2016). Zudem stört die Phosphorylierung von humanem Cdc20 an einem spezifischen Serinrest die Cdc20-abhängige Rekrutierung des E2-Enzyms Ube2S an den APC/C (Kelly *et al.*, 2014; Craney *et al.*, 2016). Somit ist für die Aktivierung des APC/C durch Cdc20 dessen De-Phosphorylierung durch die Phosphatase PP2A in der Mitose erforderlich (Labit *et al.*, 2012; Craney *et al.*, 2016; Hein und Nilsson, 2016).

Die Phosphorylierung durch Cdks kontrolliert nicht nur die Aktivierung des APC/C durch Cdc20 und Cdh1, sondern reguliert auch die Erkennung einzelner Substrate durch den APC/C-Aktivator-Komplex. In humanen Zellen stört die Phosphorylierung des Replikationsfaktors Cdc6 in der Nähe der APC/C-Erkennungssignale die Bindung und Ubiquitinierung durch APC/C-Cdh1 (Mailand und Diffley, 2005). Dadurch wird der Abbau von Cdc6 relativ zu den weiteren Cdh1-Substraten Cyclin A und Geminin verzögert, sodass sich ein Zeitfenster für die Initiierung prä-replikativer Komplexe ergibt. Darüber hinaus hemmt die Phosphorylierung von Cdk-Motiven in der Nähe der APC/C-Erkennungssignale von Pds1 und Dbf4 deren Ubiquitinierung durch APC/C-Cdc20 in *S. cerevisiae* (Holt *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2014). Speziell im Fall von Pds1 scheint dieser Mechanismus der Etablierung einer positiven Rückkopplungsschleife zu dienen, die eine abrupte Aktivierung der Separase und dadurch einen robusteren Eintritt in die Anaphase ermöglicht (Holt *et al.*, 2008). Im Gegensatz zur Situation in *S. cerevisiae* wird die APC/C-Cdc20-vermittelte Ubiquitinierung von humanem Securin durch dessen Phosphorylierung (in diesem Fall durch CaMKII) gefördert (Hellmuth *et al.*, 2014). Allerdings befinden sich die verantwortlichen Phosphorylierungsstellen in humanem Securin, relativ zu den Abbausignalen, an anderer Position als im Fall von Pds1 in *S. cerevisiae* (Holt *et al.*, 2008; Hellmuth *et al.*, 2014), sodass die Ubiquitinierung von APC/C-Substraten je nach Anordnung der APC/C-Erkennungssignale und Phosphorylierungsstellen individuell unterschiedlich durch Phosphorylierung reguliert zu sein scheint.

3.3.4.3 Regulation der APC/C-Aktivität durch Pseudo-Substrat-Inhibitoren

Neben der Kontrolle durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse und Cdk-Phosphorylierung sind verschiedene Inhibitor-Proteine an der Regulation des APC/C beteiligt, welche vor allem die Substratbindung und/oder die Aktivität des APC/C beeinflussen. In der frühen Mitose führen unbesetzte Kinetochore sowie eine fehlerhafte Verknüpfung der Chromosomen mit der Mitosespindel zu der Aktivierung des SAC (Li und Nicklas, 1995; Rieder *et al.*, 1995). Der SAC äußert sich in der Bildung eines inhibitorischen Komplexes, der als MCC (mitotic checkpoint complex) bezeichnet wird und APC/C-Cdc20 inhibiert (Musacchio und Salmon, 2007; Lara-Gonzalez *et al.*, 2012). Der MCC setzt sich aus den Proteinen Cdc20, Mad2, Mad3/BubR1 und Bub3 zusammen und die effiziente Assemblierung des MCC basiert auf der schrittweisen Rekrutierung der Komponenten an das unbesetzte Kinetochor. In der MCC-Bildung spielt Mad2 eine zentrale Rolle. Mad2 liegt ungebunden in einer offenen Konformation (O-Mad2) vor und nimmt nach Bindung an Mad1 oder Cdc20 eine geschlossene Konformation (C-Mad2) ein (Luo *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2002; Sironi *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2004). Mad2 wird zusammen mit Mad1 in Form eines Mad1-C-Mad2-Komplexes an das unbesetzte Kinetochor rekrutiert. Dort kann der Mad1-C-Mad2-Komplex weiteres O-Mad2 rekrutieren und unterstützt die Bildung eines C-Mad2-Cdc20-Komplexes (De Antoni *et al.*, 2005), nachdem Cdc20 vermutlich über Bub1 und Mad3/BubR1 an das Kinetochor gebunden hat (Di Fiore *et al.*, 2015). Der C-Mad2-Cdc20-Komplex bindet schließlich an das Heterodimer aus Bub3 und Mad3/BubR1 zur Bildung des MCC, der APC/C-Cdc20 über verschiedene Mechanismen inhibiert. Laut einer Kristallstruktur des MCC aus *S. pombe* bindet Mad2 vor allem über das sogenannte Mad2-Interaktionsmotiv (MIM) an Cdc20 (Chao *et al.*, 2012). Das MIM überlappt, zumindest in humanen Cdc20, mit dem KILR-Motiv, das für die Bindung und Aktivierung des APC/C bedeutend ist (Zhang und Lees, 2001; Izawa und Pines, 2012; Zhang *et al.*, 2016). Somit blockiert Mad2 eine produktive Interaktion zwischen Cdc20 und dem APC/C. Möglicherweise unterstützt die Mad2-vermittelte Blockade des KILR-Motivs die Positionsänderung von Cdc20 im APC/C, die nach Bindung des MCC beobachtet wurde (Herzog *et al.*, 2009). Durch die Verlagerung entfernt sich Cdc20 von Apc10/Doc1, wodurch vermutlich die Ausbildung des Co-Rezeptors für die Bindung von D-Box-Substraten gestört wird (Herzog *et al.*, 2009; Buschhorn *et al.*, 2011; da Fonseca *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2012). Darüber hinaus unterstützt Mad2 die Bindung von Mad3/BubR1 an Cdc20 (Fang, 2002; Davenport *et al.*, 2006; Burton und Solomon, 2007; Chao *et al.*, 2012). Mad3/BubR1 besitzt

zwei KEN-Motive, wovon das N-terminale KEN-Motiv an den KEN-Box-Rezeptor von Cdc20 bindet und dadurch den Zugang für Substrate mit einer KEN-Box blockiert (Burton und Solomon, 2007; Chao *et al.*, 2012). Das C-terminale KEN-Motiv ist zwar nicht für die Bindung an Cdc20, Mad2 oder den APC/C erforderlich (Burton und Solomon, 2007; King *et al.*, 2007), scheint jedoch für die Inhibition der D-Box-vermittelten Bindung von Substraten an Cdc20 notwendig zu sein (Lara-Gonzalez *et al.*, 2011). Zudem könnte die C-terminale KEN-Box von BubR1/Mad3 möglicherweise zu der Bindung eines zweiten Cdc20-Moleküls beitragen (Primorac und Musacchio, 2013; Izawa und Pines, 2015). Somit fungiert der MCC einerseits als Pseudo-Substrat-Inhibitor für KEN-Box-Substrate und verhindert andererseits die D-Box-vermittelte Bindung von Substraten durch Konformationsänderungen in APC/C-Cdc20.

Die Bindung des MCC stört zwar die Interaktion mit Substraten über die D- und KEN-Box-Rezeptoren, bewirkt jedoch keine vollständige, katalytische Inaktivität des APC/C. So werden Substrate wie Nek2A und Cyclin A, die ohne Rekrutierung durch Cdc20 an den APC/C binden bzw. mit BubR1 um die Bindung an Cdc20 konkurrieren können (Hayes *et al.*, 2006; Wolthuis *et al.*, 2008; Di Fiore und Pines, 2010; Sedgwick *et al.*, 2013; Di Fiore *et al.*, 2015), auch bei aktivem SAC durch den APC/C ubiquitiniert und degradiert (den Elzen und Pines, 2001; Geley *et al.*, 2001; Hames *et al.*, 2001). Des Weiteren wird auch Cdc20 während des aktiven SAC kontinuierlich auto-ubiquitiniert und abgebaut (Pan und Chen, 2004; Nilsson *et al.*, 2008; Foster und Morgan, 2012; Uzunova *et al.*, 2012). Dies führt zu einer Auflösung des MCC, der somit während eines aktiven SAC permanent neu gebildet werden muss. Die kontinuierliche Assemblierung und Wiederauflösung des MCC wird als Voraussetzung dafür angesehen, dass APC/C-Cdc20 schnell aktiviert werden kann, sobald alle Kinetochore regulär mit der Spindel verbunden sind und die MCC-Bildung gestoppt wird.

In Vertebraten existiert mit Emi1 ein weiterer Inhibitor, der sowohl APC/C-Cdc20 als auch APC/C-Cdh1 inhibieren kann (Reimann *et al.*, 2001a; Reimann *et al.*, 2001b; Miller und Gordon, 2005). Emi1 akkumuliert ab der G1/S-Phase und inhibiert den APC/C bis zum Eintritt in die Mitose, wenn Emi1 durch den SCF- β -TRCP-Komplex ubiquitiniert und abgebaut wird (Hsu *et al.*, 2002; Margottin-Goguet *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2004). Emi1 nutzt eine D-Box, um den entsprechenden Rezeptor im APC/C-Aktivator-Komplex zu besetzen und fungiert somit als Pseudo-Substrat-Inhibitor für D-Box-Substrate (Reimann *et al.*, 2001b; Miller *et al.*, 2006; Frye *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2015). Zusätzlich inhibiert Emi1 den APC/C auf Ebene der Ubiquitinierung und stört die Verlängerung der Ubiquitinkette an den Substraten (Frye

et al., 2013; Wang und Kirschner, 2013). Emi1 besitzt an seinem C-terminalen Ende ein LRRL-Motiv, das identisch zu dem LRRL-Motiv des E2-Enzyms Ube2S ist. Über dieses Motiv konkurriert Emi1 mit Ube2S, das die Assemblierung von Poly-Ubiquitinketten an den APC/C-Substraten vermittelt (Wu *et al.*, 2010), um die Bindung an die APC/C-Untereinheit Apc2 (Frye *et al.*, 2013; Wang und Kirschner, 2013; Chang *et al.*, 2015). Darüber hinaus scheint Emi1 auch die Übertragung des ersten Ubiquitins auf das Substrat durch das E2-Enzym UbcH10 (Summers *et al.*, 2008) zu stören, da Emi1 über seine Zink-bindende Region und seine Linker-Region die Bindestelle für UbcH10 in Apc11 blockiert (Chang *et al.*, 2015).

Mit Rca1 existiert in *D. melanogaster* ein zu Emi1 orthologes Protein, das den APC/C-Cdh1 in der G2-Phase inhibiert (Dong *et al.*, 1997; Grosskortenhaus und Sprenger, 2002). In *S. cerevisiae* findet sich hingegen kein Emi1-Ortholog. Stattdessen wurde Acm1 als Inhibitor des APC/C-Cdh1 identifiziert, der zusammen mit den 14-3-3-Proteinen Bmh1 und Bmh2 einen stabilen Komplex mit Cdh1 eingeht und als Pseudo-Substrat-Inhibitor die Bindung von Substraten blockiert (Martinez *et al.*, 2006; Dial *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008; Burton *et al.*, 2011; He *et al.*, 2013). Die Bindung an Bmh1 erfordert die Phosphorylierung von Acm1 durch Cdk1 und diese Interaktion könnte für die Stabilisierung und Re-Lokalisation von Acm1 aus dem Zellkern in das Zytoplasma verantwortlich sein, welche nach Phosphorylierung des Inhibitors beobachtet wurde (Enquist-Newman *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2008; Ostapenko *et al.*, 2008). Die Inhibition durch Acm1 dient als redundanter, jedoch nicht gleichwertiger Mechanismus zu der negativen Regulation von Cdh1 durch Cdk1-Phosphorylierung (Robbins und Cross, 2010b). Acm1 besitzt eine zentrale, inhibitorische Region (CIR, *central inhibitory region*), die hauptverantwortlich für die Inhibition von Cdh1 ist und sowohl eine KEN- als auch eine D-Box enthält. Acm1 nutzt diese Motive, um als Pseudo-Substrat die Rezeptoren für die D- und KEN-Box zu besetzen und den Zugang für APC/C-Substrate zu blockieren (Dial *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008; Enquist-Newman *et al.*, 2008; Ostapenko *et al.*, 2008; Burton *et al.*, 2011; He *et al.*, 2013). Darüber hinaus besitzt die CIR von Acm1 noch weitere Sequenzmotive wie das sogenannte A-Motiv, das für eine effiziente Bindung und maximale Inhibition von Cdh1 notwendig ist (Burton *et al.*, 2011). Das A-Motiv kontaktiert die WD40-Domäne von Cdh1 an einem wenig konservierten Bereich und diese Interaktion trägt dazu bei, dass Acm1 spezifisch Cdh1 und nicht Cdc20 inhibiert (He *et al.*, 2013). Dadurch kann APC/C-Cdc20 den Inhibitor durch Ubiquitinierung in der Anaphase für den Abbau markieren und ermöglicht so die Aktivierung von APC/C-Cdh1 (Enquist-Newman *et al.*, 2008).

4 ERGEBNISSE

Die Ubiquitin-Ligase APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) kontrolliert den Ablauf des eukaryotischen Zellteilungszyklus durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von regulatorischen Proteinen in der Mitose und der G1-Phase. Die Aktivität des APC/C ist von der Bindung der Aktivatoren Cdc20 und Cdh1 abhängig, die einerseits Substrate selektiv und mit unterschiedlicher Spezifität an den APC/C rekrutieren und andererseits den Transfer von Ubiquitin auf das Substrat unterstützen. Die Interaktion der Aktivatoren mit dem APC/C ist streng reguliert, um zu gewährleisten, dass die zahlreichen APC/C-Substrate zum richtigen Zeitpunkt im Zellteilungszyklus degradiert werden. Die Bindung von Cdh1 an den APC/C wird vornehmlich durch die Phosphorylierung des Aktivators an multiplen Cdk-Konsensus-Sequenzen negativ reguliert. Die präzise Rolle einzelner Phosphorylierungsstellen für die Regulation von Cdh1 ist bislang unklar und sollte im Rahmen dieser Arbeit detaillierter untersucht werden. Im Fall von Cdc20 ist die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse ein zentraler Mechanismus, der die Verfügbarkeit und dadurch die Interaktion von Cdc20 mit dem APC/C regelt. Dabei trägt die Cdh1-abhängige Ubiquitinierung von Cdc20 entscheidend zur Inaktivierung der APC/C-Cdc20-Isoform in der späten Mitose bei. Um tiefere Einblicke in die Regulation und die Erkennung durch APC/C-Cdh1 zu gewinnen, sollte die minimale Abbausequenz für die Cdh1-vermittelte Degradation in Cdc20 kartiert und funktionell charakterisiert werden.

Die N-terminalen Domänen der Aktivatoren gehen multiple Kontakte mit den Untereinheiten des APC/C ein und diese Interaktionen tragen vermutlich zur Aktivierung der Ubiquitin-Ligase bei. Die C-terminalen WD40-Domänen dienen der Substraterkennung und enthalten Rezeptoren für die Bindung spezifischer Sequenzmotive in den Substraten. Da die Rezeptoren der WD40-Domänen von Cdc20 und Cdh1 konserviert sind, ist die molekulare Grundlage für die unterschiedliche Substratspezifität der Aktivatoren noch unvollständig verstanden. Aufbauend auf früheren Beobachtungen sollte die Rolle der N-terminalen Domäne von Cdc20 für die APC/C-Aktivierung untersucht und in diesem Zusammenhang die Relevanz einzelner Sequenzelemente betrachtet werden. Zudem sollte mit Hilfe von Chimären aus Cdc20 und Cdh1 näher untersucht werden, welche Regionen der Aktivatoren für die Unterschiede in der Substratspezifität ursächlich sind.

4.1 Regulation von Cdh1 durch die N-terminale Domäne

Die Phosphorylierung des APC/C-Aktivatorproteins Cdh1 an Cdk-Konsensussequenzen (im Folgenden auch als Cdk-Motive bezeichnet) ist ein konservierter Mechanismus, der die Bindung von Cdh1 an den APC/C-Kernkomplex verhindert (Zachariae *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999; Lukas *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2001). In der Hefe *S. cerevisiae* konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung durch Cdk1 zusätzlich eine Translokation von Cdh1 aus dem Zellkern in das Zytoplasma bewirkt (Jaquenoud *et al.*, 2002). Wie die Phosphorylierung die subzelluläre Lokalisation von Cdh1 in *S. cerevisiae* steuert, ist noch nicht vollständig verstanden. Zudem wurde die Bedeutung einzelner Cdk-Phosphorylierungsstellen, deren Mehrzahl sich wie in den Orthologen aus anderen Organismen in der N-terminalen Domäne befindet, für die Regulation von Cdh1 bislang nicht im Detail herausgearbeitet. Um diese Punkte genauer zu erforschen, wurden in dieser Arbeit Verkürzungen und mutierte Versionen von Cdh1 hergestellt und mittels Fluoreszenzmikroskopie und Co-Immunpräzipitationsanalysen hinsichtlich Lokalisation und Wechselwirkung mit dem APC/C untersucht.

4.1.1 Die N-terminale Domäne von Cdh1 ist hinreichend für Zellzyklus-regulierte Lokalisation im Zellkern

Um die subzelluläre Lokalisation von Cdh1 und deren Regulation in *S. cerevisiae* besser zu verstehen, sollten zunächst Lokalisationsdomänen in Cdh1 identifiziert werden. Hierzu wurde das Fluoreszenzprotein GFP (*green fluorescent protein*) an Cdh1 sowie an Subfragmente des Proteins fusioniert und die Lokalisation der Fusionsproteine in lebenden Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierbei wurde zum Teil auf Konstrukte zurückgegriffen, die in einer begleitenden Arbeit hergestellt und beginnend charakterisiert wurden (Bauer, 2013). Im Vorfeld der Lokalisationsstudien wurde in Westernblot-Analysen eine vergleichbare Expression der Fusionskonstrukte in den verwendeten Stämmen überprüft (Abb. 8.2 A und C im Anhang).

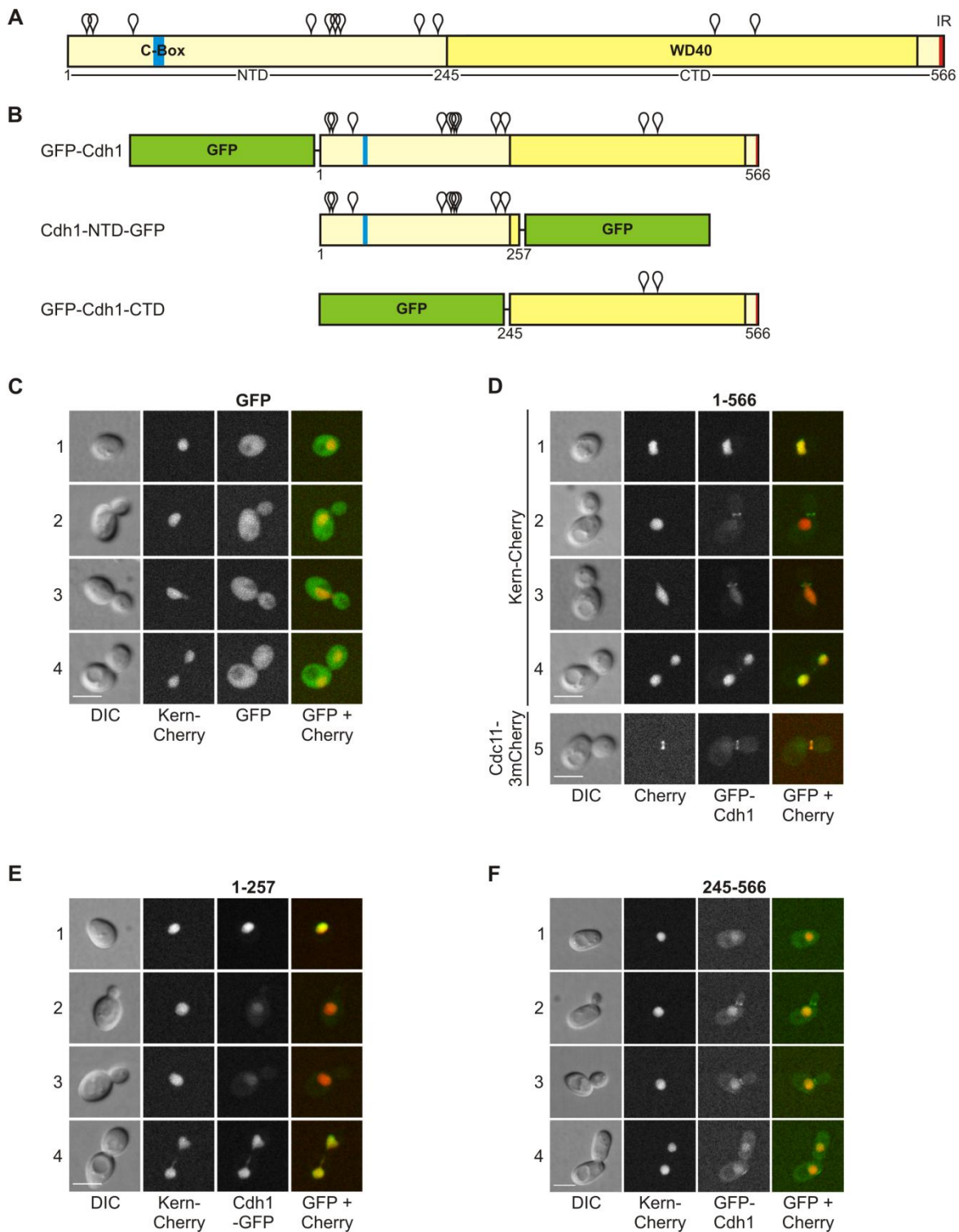


Abbildung 4.1: Lokalisation von Cdh1 Derivaten im Zellteilungszyklus

(A) Schematische Darstellung des APC/C-Aktivators Cdh1. Die C-Box (blau), die WD40-Domäne (kräftiges gelb) und das IR-Motiv (rot) sind als farbige Kästen dargestellt. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind mit weißen Pins markiert. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an. NTD: N-terminale Domäne. CTD: C-terminale Domäne. **(B)** Schematische Darstellung der GFP-Cdh1-Fusionskonstrukte basierend auf A. **(C - F)** Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die entweder *GFP* (C), *GFP-CDH1* (D), *CDH1(1-257)-GFP* (E) oder *GFP-CDH1(245-566)* exprimierten. Die Expression der GFP-Konstrukte erfolgte entweder konstitutiv von dem *TEF2*-Promotor (C, E und F) oder transient von dem regulierbaren *MET25*-Promotor (D). Zur Visualisierung des Zellkerns co-exprimierten die Zellen das Kernmarker-Konstrukt Kern-Cherry. Für das Anfärben des Septinrings

wurde *CDC11* als endogene 3mCherry-Fusion co-exprimiert (Bildreihe 5 in D). Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

Cdh1 lässt sich in eine N-terminale Domäne (NTD) und eine C-terminale Domäne (CTD) unterteilen (Abb. 4.1 A). Während die CTD die charakteristische WD40-Domäne umfasst, die an der Bindung von Substraten beteiligt ist (Chao *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013), enthält die NTD neun der elf Cdk-Phosphorylierungsstellen. In einem ersten Ansatz wurde entweder die NTD oder die CTD von Cdh1 an GFP fusioniert (Abb. 4.1 B). Die entstandenen Konstrukte wurden von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimiert und hinsichtlich der subzellulären Lokalisation mit Cdh1 in voller Länge verglichen, das als N-terminale GFP-Fusion (GFP-Cdh1) transient von dem regulierbaren *MET25*-Promotor exprimiert wurde. Die Zellen exprimierten zusätzlich ein Konstrukt zur Visualisierung des Zellkerns (Arnold *et al.*, 2015), das sich aus dem roten Fluoreszenzprotein mCherry und der Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear localization sequence*) des Transkriptionsfaktors Swi5 (Moll *et al.*, 1991) zusammensetzt und im weiteren Verlauf als Kern-Cherry bezeichnet wird. Im Gegensatz zu freiem, nicht-fusioniertem GFP, das in allen Zellzyklusphasen homogen in der Zelle verteilt war (Abb. 4.1 C), änderte GFP-Cdh1 seine Lokalisation im Laufe des Zellzyklus (Abb. 4.1 D) in Übereinstimmung mit früheren Daten (Jaquenoud *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2006). In Zellen der G1-Phase sowie in spät-mitotischen Zellen, in denen sich der Zellkern bereits in zwei separate Strukturen getrennt hatte, lokalisierte GFP-Cdh1 ausschließlich im Zellkern (Abb. 4.1 D, Bildreihen 1 und 4). Dagegen war GFP-Cdh1 in Zellen mit Knospe und einem nicht getrennten Zellkern überwiegend zytoplasmatisch und nur geringfügig im Zellkern angereichert (Abb. 4.1 D, Bildreihen 2 und 3). Zusätzlich zur Verteilung im Zytoplasma wies GFP-Cdh1 in Zellen mit Knospe ein ringförmiges Signal am Knospenhals auf (Abb. 4.1 D, Bildreihen 2 und 3). Dieses Signal co-lokalisierte mit dem des Septins Cdc11 (Abb. 4.1 D, Bildreihe 5), das mit Hilfe einer mCherry-Fusion visualisiert wurde (Cdc11-3mCherry).

Interessanterweise zeigte das verkürzte Konstrukt Cdh1(1-257)-GFP, das die NTD von Cdh1 enthält, ebenso wie Cdh1 in voller Länge eine regulierte Lokalisation im Zellkern. So wies Cdh1(1-257)-GFP ein intensives Kernsignal in Zellen der G1-Phase und der späten Mitose auf (Abb. 4.1 E, Bildreihen 1 und 4), war jedoch in den übrigen Zellzyklusphasen im Zytoplasma verteilt und nur schwach im Zellkern zu detektieren (Abb. 4.1 E, Bildreihen 2 und 3). Anders als Cdh1 in voller Länge lokalisierte Cdh1(1-257)-GFP nicht am Knospenhals. Diese

Beobachtung deckt sich mit Aussagen früherer Arbeiten, nach denen eine intakte WD40-Domäne für die Lokalisation von Cdh1 an dieser Struktur notwendig ist (Jaquenoud *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2012). Damit übereinstimmend konnte das CTD-Konstrukt GFP-Cdh1(245-566), das die gesamte WD40-Domäne umfasst, am Knospenhals nachgewiesen werden (Abb. 4.1 F, Bildreihen 2 und 3). Dies zeigt, dass die WD40-Domäne nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die Lokalisation an dieser Struktur ist. Zusätzlich zu dem Signal am Knospenhals war GFP-Cdh1(245-566) während aller Zellzyklusphasen im Zytoplasma und im Zellkern vorzufinden (Abb. 4.1 F). Im Gegensatz zum NTD-Konstrukt änderte sich die Verteilung von GFP-Cdh1(245-566) zwischen Zellkern und Zytoplasma nicht im Laufe des Zellzyklus. Dies deutet darauf hin, dass die CTD nicht zur Regulation der Kernlokalisation von Cdh1 beiträgt. Da die WD40-Domäne Rezeptoren für die Bindung von APC/C-Substraten besitzt (Chao *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013), könnte die Lokalisation des CTD-Konstrukts vielmehr durch die Wechselwirkung mit Substraten im Zellkern und am Knospenhals bedingt sein. Somit zeigen diese Daten, dass die NTD von Cdh1 hinreichend für dessen regulierte Lokalisation im Zellkern ist, während die CTD entscheidend für die Rekrutierung des Aktivators an den Knospenhals ist.

Im Gegensatz zu GFP-Cdh1 erzeugte die konstitutive Überexpression des verkürzten NTD-Konstrukts ein robustes Signal für die Mikroskopie ohne das Zellwachstum zu stören (Abb 8.2 B und D im Anhang). Dies ermöglichte Aufnahmen mit geringen Laserintensitäten, wodurch Phototoxizität vermieden und längere Zeitrafferaufnahmen durchgeführt werden konnten. Daher stellte Cdh1(1-257)-GFP ein geeignetes Konstrukt dar, um Änderungen in der Kernlokalisation von Cdh1 im Zellzyklus zeitlich detailliert aufzulösen. Hierzu wurden von Zellen, die *CDH1(1-257)-GFP* konstitutiv exprimierten, Aufnahmen über einen Zeitraum von zwei Stunden in 5-minütigen Abständen gemacht, sodass die Lokalisation von Cdh1(1-257)-GFP über einen gesamten Zellzyklus hinweg verfolgt werden konnte. Die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals innerhalb des Zellkerns wurde anschließend quantifiziert, um die Änderungen der Proteinmenge von Cdh1(1-257)-GFP im Zellkern ermitteln zu können.

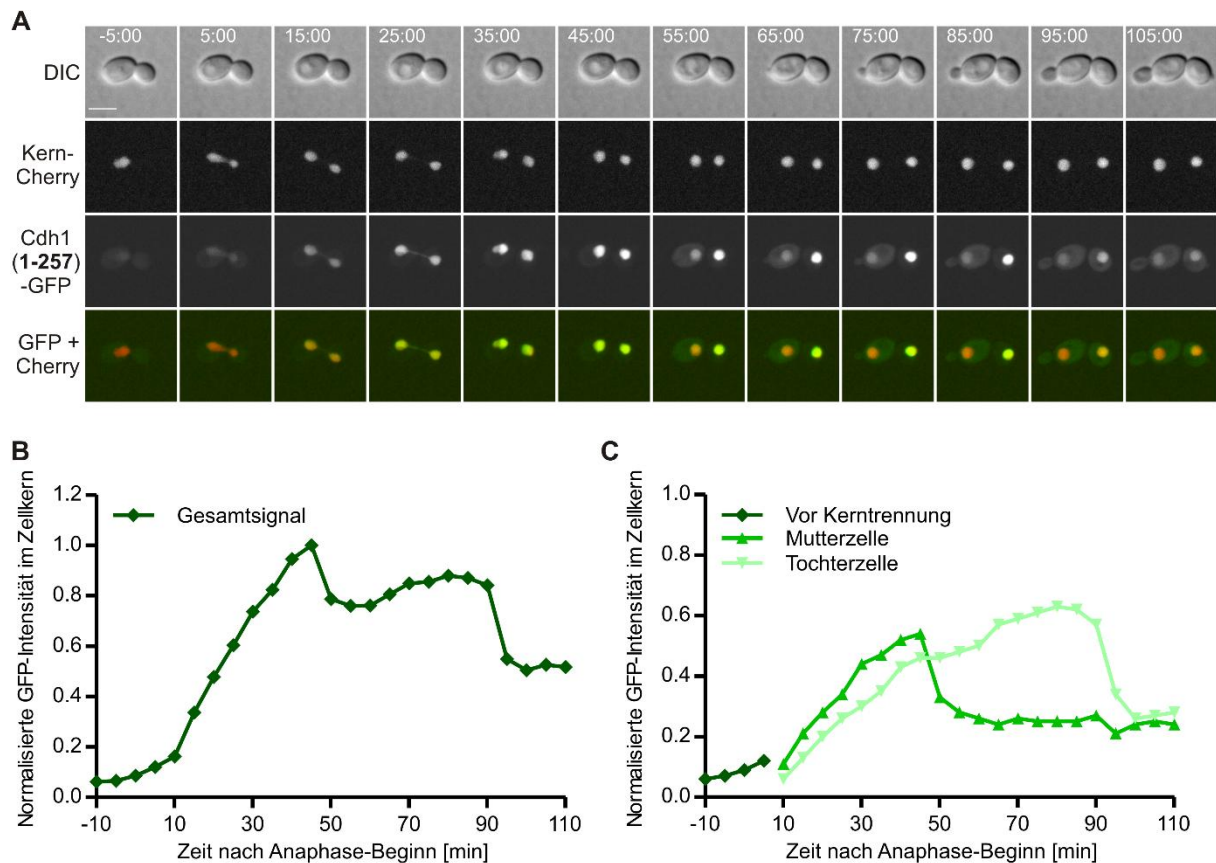


Abbildung 4.2: Nukleo-zytoplasmatischer Transport von Cdh1(1-257)-GFP im Zellteilungszyklus

(A) Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die *CDH1(1-257)-GFP* von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Es wurden über einen Zeitraum von 2 h Zeitrafferaufnahmen mit Abständen von 5 min erstellt. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Die beginnende Elongation des Zellkerns wurde als Anaphase-Beginn festgelegt und diente als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min). Es sind ausgewählte Zeitwerte einer repräsentativen Zelle gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. (B und C) Quantifizierung der GFP-Intensität im Zellkern der in A gezeigten Zelle. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde auf den Maximalwert des Gesamtsignals normiert und gegen die Zeit aufgetragen. Das Gesamtsignal (B) umfasst hierbei ausschließlich das GFP-Signal im Zellkern (Kapitel 6.4.2) und setzt sich nach der Kertrennung aus der Summe der nukleären GFP-Signale von Mutter- und Tochterzelle (C) zusammen. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

Vor Beginn der Anaphase war Cdh1(1-257)-GFP in der gesamten Zelle verteilt und leicht im Zellkern angereichert (Abb. 4.2 A). Nach Beginn der Kertrennung in der Anaphase stieg das GFP-Signal im Zellkern graduell an, während gleichzeitig das GFP-Signal im Zytoplasma abnahm. Daraus lässt sich schließen, dass zytoplasmatisches Cdh1(1-257)-GFP während der Anaphase in den Zellkern importiert wurde. Nach vollständiger Trennung des Zellkerns waren die gemessenen Intensitäten der nukleären GFP-Signale maximal (Abb. 4.2 A) und erreichten in manchen Zellen mehr als das Zehnfache des Ausgangssignals vor Beginn der Anaphase (Abb. 4.2 B). Anschließend konnte in der Mutterzelle eine abrupte Verringerung des nukleären GFP-Signals um mehr als 40% innerhalb von 5 min beobachtet werden (Abb.

4.2 A und C). Die rasche Signalabnahme im Zellkern ging mit einem ebenso abrupten Anstieg von GFP-Signal im Zytoplasma der Mutterzelle einher (Abb. 4.2 A), was für einen aktiven Export von Cdh1(1-257)-GFP aus dem Zellkern in das Zytoplasma spricht. Interessanterweise trat der Export von Cdh1(1-257)-GFP in der Tochterzelle verzögert zur Mutterzelle auf (Abb. 4.2 A und C), wobei der zeitliche Abstand zwischen dem Export von Cdh1(1-257)-GFP in der Mutter- und in der Tochterzelle von Zelle zu Zelle variierte. Dies zeigt, dass die Translokation von Cdh1(1-257)-GFP in das Zytoplasma unabhängig von vorangegangenen Ereignissen der Mitose, wie dem Abbau der Spindel oder der Zytokinese, erfolgt. Stattdessen wurde beobachtet, dass der Export von Cdh1(1-257)-GFP mit der Bildung einer neuen Knospe korreliert, die den Eintritt in die nächste Runde des Zellteilungszyklus markiert. Zusammengefasst sprechen diese Daten dafür, dass Cdh1 zu Beginn der Anaphase in den Zellkern importiert und am Ende der G1-Phase wieder in das Zytoplasma exportiert wird.

4.1.2 Die N-terminale Domäne von Cdh1 enthält eine Zellzyklus-regulierte Kernlokalisationssequenz (NLS)

Um den Bereich, der für die regulierte Kernlokalisierung von Cdh1 verantwortlich ist, weiter einzugrenzen, wurden Verkürzungen der NTD hergestellt und mit GFP fusioniert. Anschließend wurden die Fusionsproteine hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation mit Cdh1(1-257)-GFP verglichen (Abb. 4.3 A). Dazu wurde zunächst das GFP-Signal in Zellen untersucht, die sich entweder vor der Anaphase oder in der späten Anaphase befanden. Von Konstrukten, die eine regulierte Kernlokalisierung zeigten, wurde außerdem der Kerntransport im Verlauf des Zellzyklus mittels Zeitrafferaufnahmen präziser erfasst.

In einem ersten Schritt wurde die NTD halbiert, wodurch die Konstrukte Cdh1(1-144)-GFP und Cdh1(145-257)-GFP entstanden. Das Konstrukt Cdh1(145-257)-GFP, das den hinteren Teil der NTD umfasst, war in Zellen der späten Anaphase nicht im Zellkern angereichert (Abb. 4.3 A, Bildreihe 2). Stattdessen war das Protein in allen Zellzyklusstadien über die gesamte Zelle verteilt und ähnelte in seinem Lokalisationsmuster nicht-fusioniertem GFP (Abb. 4.1 C).

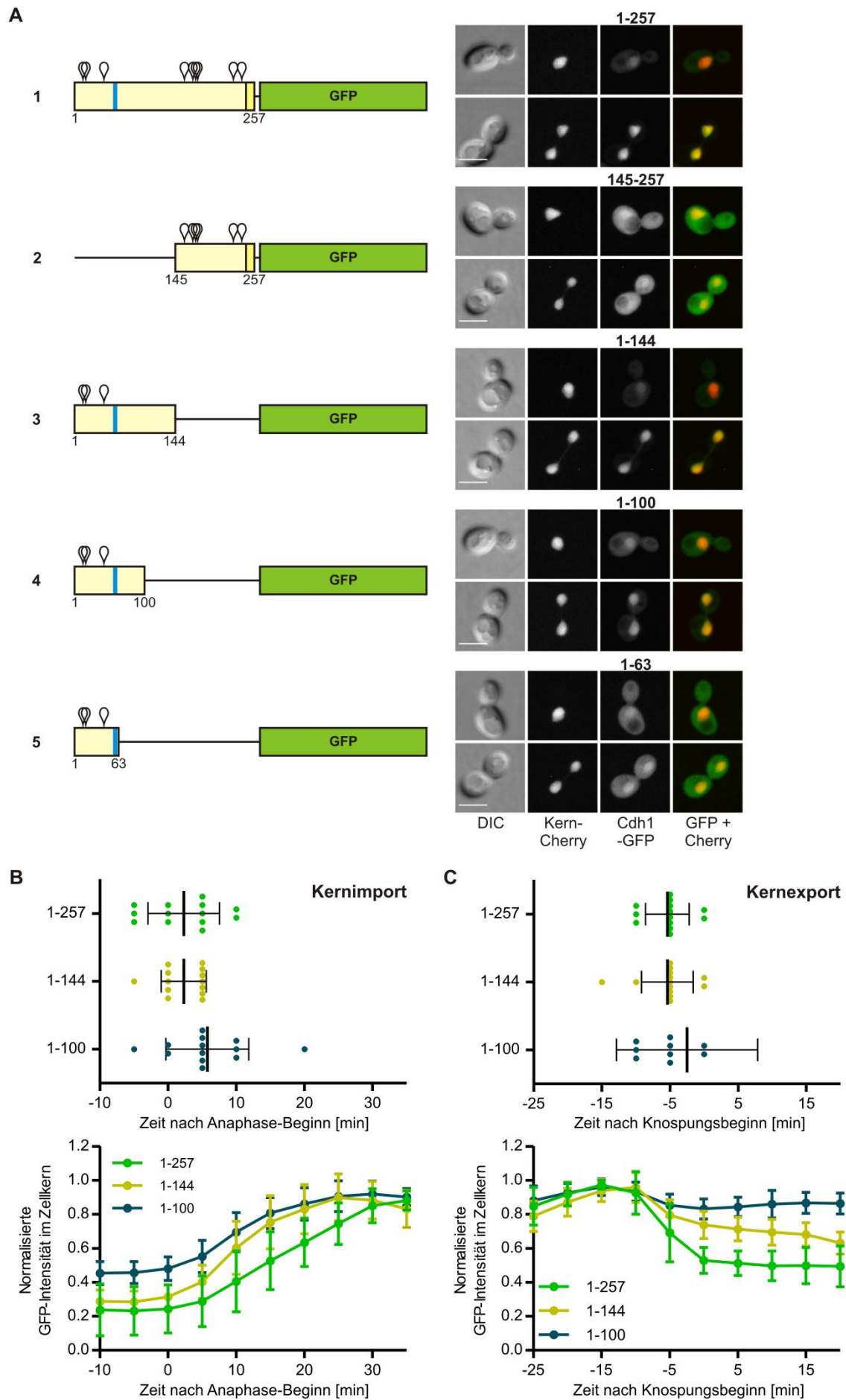


Abbildung 4.3: Regionen für nukleo-zytoplasmatischen Transport in der NTD von Cdh1

(A) Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, welche die angegebenen Verkürzungen der NTD von Cdh1 als GFP-Fusionskonstrukte von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Für jedes Konstrukt sind repräsentative, mitotische Zellen gezeigt, die sich entweder vor der Anaphase (obere Bildreihe) oder in der späten Anaphase (untere Bildreihe) befinden. Die Stämme co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Zur Veranschaulichung sind schematische Darstellungen der Cdh1-Fusionskonstrukte gezeigt. Die C-Box (blau) und der Beginn der WD40-Domäne (kräftiges gelb) sind durch farbige Kästen markiert. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind durch weiße Pins und deletierte Regionen sind durch schwarze Linien gekennzeichnet. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **(B und C)** Vergleich von Cdh1-GFP-Fusionskonstrukten hinsichtlich des Zeitpunkts und der Dynamik ihres Kernimports (B) und –exports (C). Wachsende Zellen, die entweder *CDH1(1-257)-GFP* (1-257, grün), *CDH1(1-144)-GFP* (1-144, dunkelgelb) oder *CDH1(1-100)-GFP* (1-100, petrol) von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten, wurden in 5-minütigen Abständen über einen Zeitraum von zwei Stunden aufgenommen und die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals im Zellkern (Kapitel 6.4.2) quantifiziert. Die für einzelne Zellen gemessenen Werte wurden auf den Maximalwert normiert und für jeden Stamm die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Zellen gegen die Zeit in einem Liniendiagramm aufgetragen. Der Zeitpunkt, an welchem das nukleäre Gesamtsignal um mehr als 10% anstieg bzw. abnahm, wurde als Beginn des Imports (B) bzw. des Exports (C) definiert und in Form eines Streudiagramms dargestellt. In den Streudiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine einzelne Zelle und die Mittel- und Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert und der Standardabweichung. In B wurde die beginnende Elongation des Zellkerns als Beginn der Anaphase definiert und als zeitlicher Bezugspunkt festgelegt. In C wurde der Knospungsbeginn als zeitlicher Referenzpunkt ausgewählt, welcher an Hand der ersten sichtbaren Veränderung an der künftigen Knospungsstelle bestimmt wurde. Die Stichprobengröße betrug $n = 13$ Zellen. Die Kriterien für die Festlegung des Exportbeginns erfüllten im Fall von Cdh1(1-100)-GFP nur 9 der 13 analysierten Zellen (Streudiagramm in C). Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

Im Gegensatz dazu zeigte Cdh1(1-144)-GFP, das den vorderen Teil der NTD enthält, immer noch Zellzyklus-regulierte Kernlokalisation, da das Fusionsprotein in Zellen vor der Anaphase überwiegend zytoplasmatisch war, aber in der späten Mitose im Zellkern lokalisierte (Abb. 4.3 A, Bildreihe 3). Dies deutete darauf hin, dass die Sequenzen für die regulierte Kernlokalisation von Cdh1 innerhalb der N-terminalen 144 Aminosäuren liegen.

Um den Zeitpunkt und die Dynamik des Kerntransports von Cdh1(1-257)-GFP und Cdh1(1-144)-GFP und anderer Derivaten vergleichen zu können, wurden Anstieg und Abnahme des nukleären GFP-Signals für einzelne Zellen gemessen und auf den Beginn der Kerntrennung beziehungsweise die Bildung einer neuen Knospe bezogen. Dabei zeigte sich, dass der Kernimport von Cdh1(1-257)-GFP 2,3 min ($\pm 5,3$ min; $n = 13$ Zellen) nach Beginn der Kerntrennung startete (Abb. 4.3 B) und die gemessene Fluoreszenzintensität im Zellkern durchschnittlich um das Vierfache anstieg. Der Export von Cdh1(1-257)-GFP ins Zytoplasma begann im Mittel 5,4 min ($\pm 3,2$ min; $n = 13$ Zellen) bevor die Bildung einer neuen Knospe sichtbar wurde (Abb. 4.3 C). Die Abnahme des Kernsignals erfolgte zunächst sehr abrupt, sodass die im Zellkern gemessene Signalintensität innerhalb der ersten 15 min um etwa die

Hälfte sank (Abb. 4.3 C). Anschließend nahm die Menge an nukleärem Cdh1(1-257)-GFP nur in geringen Raten ab. Cdh1(1-144)-GFP verhielt sich bezüglich des Zeitpunkts und der Dynamik des Kernimports weitestgehend wie Cdh1(1-257)-GFP (Abb. 4.3 B). Allerdings wies Cdh1(1-144)-GFP ein reduziertes Kernexportverhalten auf, da das nukleäre GFP-Signal im Fall von Cdh1(1-144)-GFP in geringerem Umfang abnahm als im Fall von Cdh1(1-257)-GFP (Abb. 4.3. C). Dieser negative Effekt auf den Kernexport wurde verstärkt, wenn die C-terminale Verkürzung der NTD erweitert wurde. So erfolgte der Export von Cdh1(1-100)-GFP nur in sehr geringen Raten, sodass die gemessene Signalintensität im Zellkern auch 25 min nach Exportbeginn nicht unter 80% des Maximalwerts fiel (Abb. 4.3 C). Dies zeigt, dass Sequenzen innerhalb der Aminosäuren 100-257 notwendig für einen effizienten Export von Cdh1 aus dem Zellkern sind. Im Gegensatz zu Cdh1(1-144)-GFP und Cdh1(1-257)-GFP wies Cdh1(1-100)-GFP in Zellen vor der Anaphase ein erhöhtes Kernsignal auf (Abb. 4.3 A, Bildreihe 4, und B), das durch den ineffizienten Export des Proteins erklärt werden kann. Trotz des reduzierten Exports akkumulierte Cdh1(1-100)-GFP weiterhin mit Beginn der Anaphase im Zellkern, wodurch sich die Fluoreszenzintensität des nukleären GFP-Signals verdoppelte (Abb. 4.3 B). Diese Daten lassen vermuten, dass sich innerhalb der Aminosäuren 1-100 von Cdh1 eine Zellzyklus-regulierte NLS befindet, die während der Anaphase aktiv wird.

In der Tat kann mit Hilfe eines bioinformatischen Programms (Kosugi *et al.*, 2009) eine bipartite NLS innerhalb der Aminosäuren 24-50 in Cdh1 vorhergesagt werden (Abb. 4.4 A). Um die Vorhersage auf ihre Richtigkeit zu überprüfen, wurden in Cdh1(1-257)-GFP alle basischen Aminosäurereste der potentiellen NLS durch Alaninreste ersetzt und anschließend die Lokalisation der hergestellten NLSm-Mutante untersucht. Das NLSm-Konstrukt lokalisierte in allen Phasen des Zellzyklus im Zytoplasma und reicherte sich in Zellen der späten Mitose nicht im Zellkern an (Abb. 4.4 B, Bildreihe 1). Dies bestätigte die vorhergesagte Sequenz als notwendigen Bestandteil einer funktionellen NLS, die für die Kernlokalisierung von Cdh1 verantwortlich ist. Da ein Konstrukt bestehend aus den N-terminalen 63 Aminosäuren, Cdh1(1-63)-GFP, in allen Zellzyklusphasen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisierte und sich während der Anaphase kaum im Zellkern anreicherte (Abb. 4.3 A, Bildreihe 5), scheinen jedoch Sequenzen, die sich C-terminal zu dem identifizierten NLS-Bereich befinden, ebenfalls notwendig für eine effiziente Lokalisation im Zellkern zu sein.

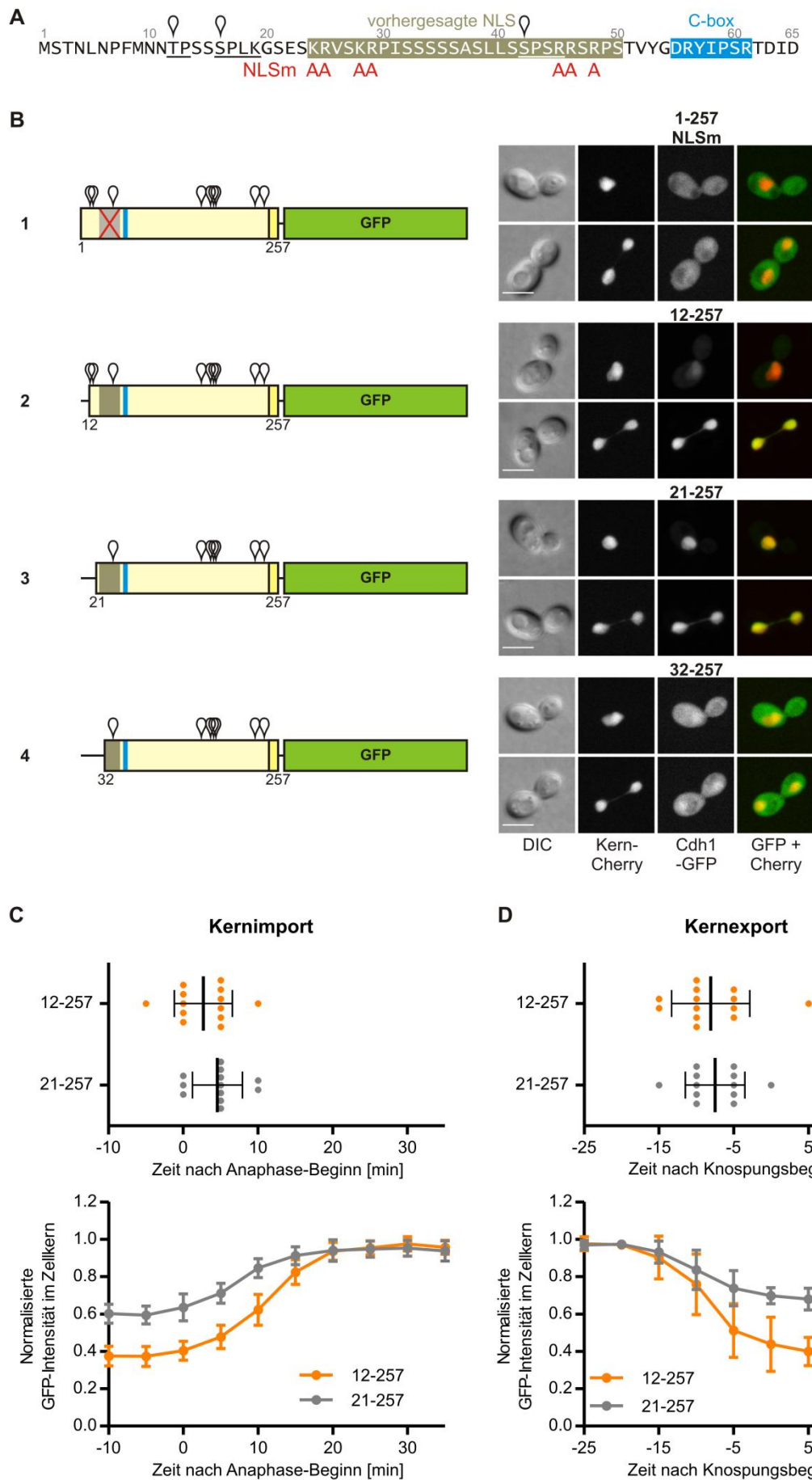


Abbildung 4.4: Identifizierung der NLS in der NTD von Cdh1

(A) Sequenz der N-terminalen 65 Aminosäuren von Cdh1 aus *S. cerevisiae*. Die C-Box (blau) und die durch bioinformatische Analyse (Kosugi *et al.*, 2009) vorhergesagten NLS (oliv) sind durch farbige Kästen hervorgehoben. Die durch Alanin-Substitutionen mutierten Aminosäuren innerhalb der vorhergesagten NLS (NLSm) sind durch den roten Buchstaben A gekennzeichnet. Die Sequenzen der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind unterstrichen und ihre Positionen sind durch weiße Pins markiert. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen. **(B)** Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, welche die angegebenen verkürzten oder mutierten Versionen der NTD von Cdh1 als GFP-Fusionskonstrukte von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Für jedes Konstrukt sind repräsentative, mitotische Zellen gezeigt, die sich entweder vor der Anaphase (obere Bildreihe) oder in der späten Anaphase (untere Bildreihe) befinden. Die Stämme co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Zur Veranschaulichung sind schematische Darstellungen der Cdh1-Fusionskonstrukte gezeigt. Die vorhergesagte NLS (oliv), die C-Box (blau) und der Beginn der WD40-Domäne (kräftiges gelb) sind durch farbige Kästen markiert. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind durch weiße Pins und deletierte Regionen sind durch schwarze Linien gekennzeichnet. Die Mutation der NLS ist durch ein rotes Kreuz symbolisiert. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **(C und D)** Vergleich von *CDH1(12-257)-GFP* (12-257, orange) und *CDH1(21-257)-GFP* (21-257, grau) hinsichtlich des Zeitpunkts und der Dynamik ihres Kernimports (C) und –exports (D). Die Expression und Mikroskopie der Konstrukte sowie die Quantifizierung des GFP-Signals im Zellkern erfolgte wie in Abbildung 4.3, B und C. Die Stichprobengröße betrug n = 13 Zellen für Cdh1(12-257)-GFP und n = 12 für Cdh1(21-257)-GFP. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

Interessanterweise befinden sich zwei Cdk-Phosphorylierungsstellen unmittelbar vor der vorhergesagten NLS, während eine weitere Cdk-Phosphorylierungsstelle mit der NLS überlappt (Abb. 4.4 A). Da in mehreren Fällen gezeigt werden konnte, dass Phosphorylierung durch Cdk1 die Aktivität einer NLS kontrollieren kann (Moll *et al.*, 1991; Sidorova *et al.*, 1995; O'Conallain *et al.*, 1999; Liku *et al.*, 2005; Kosugi *et al.*, 2009), stellte sich die Frage, ob dies auch für Cdh1 zutrifft. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden in einer ersten Herangehensweise N-terminale Verkürzungen von Cdh1(1-257)-GFP hergestellt und auf ihre Lokalisation hin untersucht.

Die Deletion der Aminosäuren 1-11 blieb ohne wesentlichen Einfluss auf den Kerntransport. Ebenso wie Cdh1(1-257)-GFP war das verkürzte Konstrukt Cdh1(12-257)-GFP vor der Anaphase vorwiegend zytoplasmatisch und zeigte ein intensives und exklusives Kernsignal in Zellen der späten Mitose (Abb. 4.4 B, Bildreihe 2). Cdh1(12-257)-GFP ähnelte dem Konstrukt mit intakter NTD auch mit Blick auf die Dynamik und den Zeitpunkt des Imports und Exports (Abb. 4.4 C und D). Indessen wies das Konstrukt Cdh1(21-257)-GFP, dem durch Deletion der N-terminalen 20 Aminosäuren die zwei Cdk-Phosphorylierungsstellen vor dem identifizierten NLS-Bereich entfernt wurden, nicht nur in der späten Mitose, sondern auch vor der Anaphase ein kräftiges Signal im Zellkern auf (Abb. 4.4 B, Bildreihe 3). Diese weitestgehend konstitutive Kernlokalisation deutete auf einen reduzierten Kerntransport hin. In der Tat

bekräftigte die Quantifizierung des nukleären GFP-Signals von Cdh1(21-257)-GFP, dass sich die Intensität des Kernsignals während des Zellzyklus im Vergleich zu Cdh1(12-257)-GFP in deutlich geringerem Maße änderte (Abb. 4.4 C und D). Daraus lässt sich schließen, dass die vorderen zwei Cdk-Phosphorylierungsstellen einen wichtigen Beitrag zur Regulation der Kernlokalisierung von Cdh1 leisten. Eine weitere Verkürzung der NTD, durch welche die basischen Aminosäuren im N-terminalen Bereich der vorhergesagten NLS entfernt wurden, verhinderte den Import des Proteins in den Zellkern. Das betreffende Konstrukt Cdh1(32-257)-GFP lokalisierte vornehmlich im Zytoplasma und akkumulierte während der Anaphase nicht im Zellkern (Abb. 4.4 B, Bildreihe 4). Dies bestätigt die Vorhersage der NLS zusätzlich und hebt die Bedeutung des vorderen Bereichs basischer Aminosäuren für die Funktion der NLS hervor. Zusammengefasst zeigt die Analyse der verkürzten Cdh1-Derivate, dass die NTD von Cdh1 eine NLS enthält, deren Aktivität im Zellzyklus reguliert ist. Zu dieser Regulation trägt der Bereich bei, der unmittelbar N-terminal zur NLS liegt und die Cdk-Phosphorylierungsstellen 1 und 2 mit einschließt.

4.1.3 Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 steuern die Kernlokalisierung von Cdh1

Die Beobachtung, dass die Entfernung von zwei Cdk-Phosphorylierungsstellen zu einem nahezu konstitutiven Verbleib des NTD-Konstrukts im Zellkern führte, deutete auf eine Regulation des Kernimports durch Cdk1-Phosphorylierung hin. In der Tat konnte in einer früheren Arbeit bereits gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch Cdk1 die Lokalisation von Cdh1 im Zellkern negativ beeinflusst (Jaquenoud *et al.*, 2002). Um die Regulation der Kernlokalisierung von Cdh1 durch Cdk1-Phosphorylierung tiefergehend zu untersuchen, wurden die Cdk-Phosphorylierungsstellen der NTD gezielt mutiert und die Auswirkungen der Mutationen auf die zelluläre Verteilung von Cdh1(1-257)-GFP untersucht. Zunächst wurden die Serin- und Threoninreste aller neun Cdk-Phosphorylierungsstellen durch Alaninreste ersetzt, um ein Konstrukt herzustellen, das nicht mehr durch Cdk1 phosphoryliert werden kann und das als Cdh1(1-257)-m(1-9)A-GFP bezeichnet wurde. Wie erwartet lokalisierte die m(1-9)A-Mutante nicht mehr wie das Wildtyp-Konstrukt im Zytoplasma und befand sich stattdessen in allen Zellzyklusphasen im Zellkern (Abb. 4.5 A). Zudem blieb die gemessene Fluoreszenzintensität des Kernsignals über den gesamten Zellzyklus hinweg konstant. Dies bestätigt, dass die Kernlokalisierung von Cdh1 durch Cdk-Phosphorylierungsstellen in der NTD gesteuert wird.

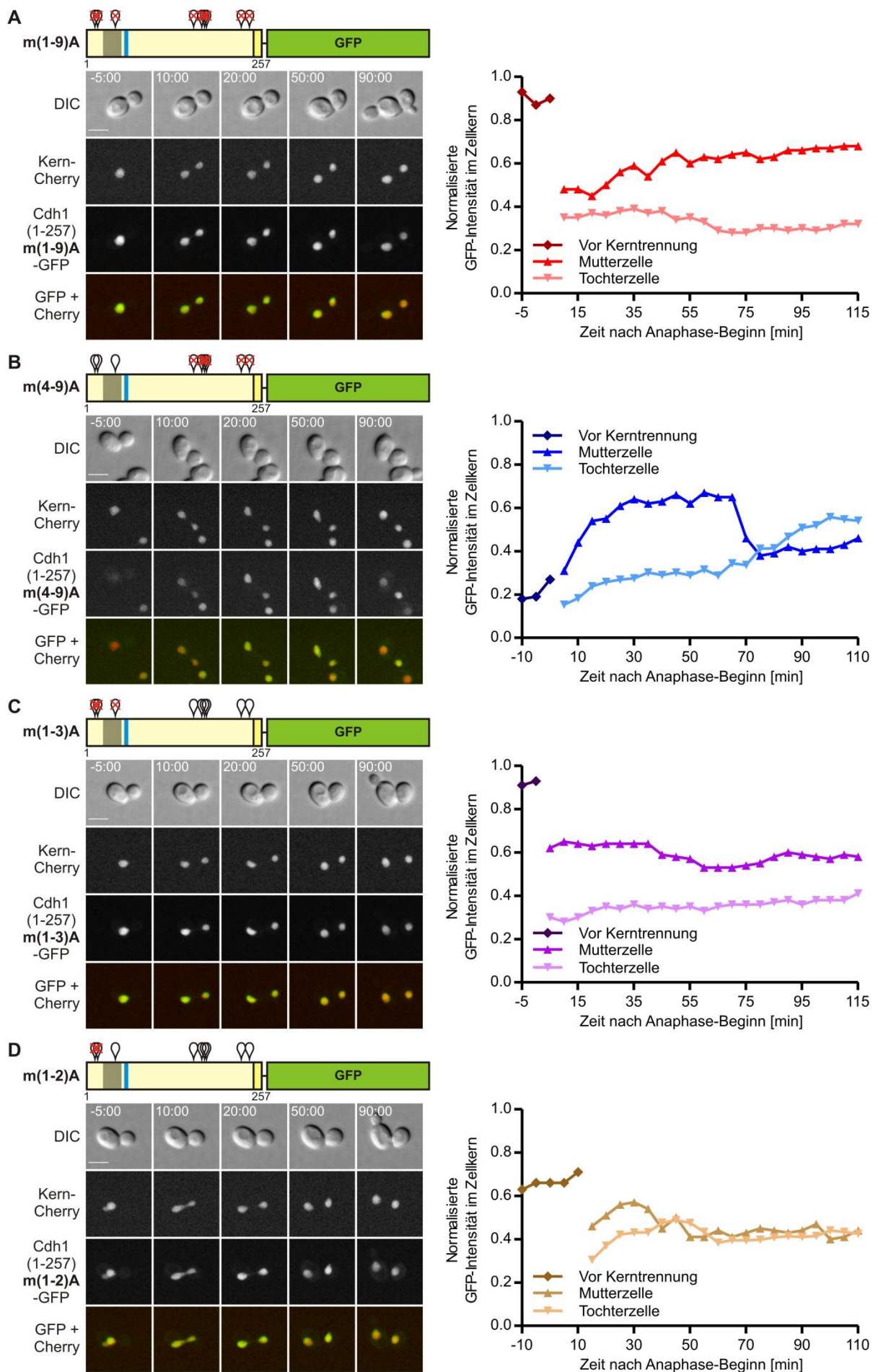


Abbildung 4.5: Nukleo-zytoplasmatischer Transport von Cdh1(1-257)-GFP nach Entfernung von Cdk-Phosphorylierungsstellen

(A – D) Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, welche *CDH1(1-257)-m(1-9)A-GFP* (A), *CDH1(1-257)-m(4-9)A-GFP* (B), *CDH1(1-257)-m(1-3)A-GFP* (C) oder *CDH1(1-257)-m(1-2)A-GFP* (D) von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Es wurden über einen Zeitraum von 2 h Zeitrafferaufnahmen mit Abständen von 5 min erstellt. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Für jedes Konstrukt sind ausgewählte Zeitwerte für eine repräsentative Zelle gezeigt. Die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals im Zellkern wurde für die gezeigten Zellen wie in Abbildung 4.2 quantifiziert. Die beginnende Elongation des Zellkerns wurde als Anaphase-Beginn festgelegt und diente als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min). Zur Veranschaulichung sind schematische Darstellungen der Fusionskonstrukte gezeigt. Die NLS (oliv), die C-Box (blau) und der Beginn der WD40-Domäne (kräftiges gelb) sind durch farbige Kästen hervorgehoben. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind mit weißen Pins markiert. Rote Kreuze kennzeichnen die Mutation von Phosphat-akzeptierenden Aminosäureresten zu Alaninresten (S/TP zu AP). Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

Die Beobachtung, dass Cdh1(1-144)-GFP, welches nur drei der neun N-terminalen Cdk-Phosphorylierungsstellen enthält, immer noch reguliert im Zellkern lokalisierte, ließ vermuten, dass die Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 für die Kontrolle der Cdh1-Lokalisation verzichtbar sind. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden in Cdh1(1-257)-GFP nur die Serin- oder Threoninreste der Phosphorylierungsstellen 4-9 durch Alaninreste ausgetauscht, während die Phosphorylierungsstellen 1-3 nicht verändert wurden. Zusätzlich wurde ein komplementäres Konstrukt hergestellt, in welchem die Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 durch Alanin-Substitutionen mutiert und die übrigen Phosphorylierungsstellen intakt gelassen wurden.

Die m(4-9)A-Mutante, in der eine Phosphorylierung der Cdk-Motiven 1-3 noch möglich ist, änderte wie das Wildtyp-Konstrukt seine Lokalisation im Verlauf des Zellzyklus (Abb. 4.5 B) und verhielt sich auch in Zeitpunkt und Dynamik des Kernimports und -exports sehr ähnlich zu der Wildtyp-Version (Abb. 4.7). Daraus lässt sich schließen, dass die Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 hinreichend für die Regulation der Kernlokalisierung von Cdh1 sind. In Übereinstimmung mit dieser Schlussfolgerung genügte die Mutation der Cdk-Motive 1-3, um eine Relokalisierung des Fusionsproteins in das Zytoplasma zu verhindern. Ebenso wie die m(1-9)A-Mutante wies das m(1-3)A-Konstrukt ein konstitutives Kernsignal auf, das sich im Verlauf des Zellzyklus nicht änderte (Abb. 4.5 C). Wurden dagegen nur die Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-2 durch Alanin-Substitutionen inaktiviert, konnten geringfügige Zu- und Abnahmen des Kernsignals während des Zellzyklus festgestellt werden (Abb. 4.5 D und 4.7). Das betreffende m(1-2)A-Konstrukt zeigte zwar in allen Zellzyklusphasen ein prominentes GFP-Signal im Zellkern, jedoch konnte am Ende der G1-Phase eine partielle

Relokalisation des Konstrukts in das Zytoplasma bei gleichzeitiger Abnahme des Kernsignals beobachtet werden (Abb. 4.5 D und 4.7 B). Zudem wurde während der Anaphase eine ansteigende Fluoreszenzintensität im Zellkern gemessen, die jedoch in einem geringeren Maße zunahm als im Fall des Wildtyp-Konstrukts (Abb. 4.7 A). Im Gegensatz zum Export wurde für den Importbeginn der m(1-2)A-Mutante ein späterer Zeitwert registriert als für den Importbeginn der Wildtyp-Version Cdh1(1-257)-GFP (Abb. 4.7 A). Allerdings könnte diese Abweichung durch die bereits vor der Anaphase hohe Signalintensität von Cdh1(1-257)-m(1-2)A-GFP im Zellkern bedingt sein, die den beginnenden Anstieg des Kernsignals möglicherweise überdeckt und dadurch die exakte Bestimmung des Importbeginns erschwert. Das in allen Zellzyklusphasen gut detektierbare Kernsignal der m(1-2)A-Mutante deutet auf einen wichtigen Beitrag der Cdk-Motive 1 und 2 für die Regulation der Kernlokalisation hin. Auf der anderen Seite zeigt die leichte Fluktuation des nukleären GFP-Signals, dass die dritte Cdk-Phosphorylierungsstelle ebenfalls an der Regulation beteiligt ist. Der regulierte Kerntransport der m(4-9)A-Mutante weist darauf hin, dass die Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 für die Kontrolle der Cdh1-Lokalisation nicht notwendig sind. Dies schließt jedoch nicht aus, dass eine Phosphorylierung an diesen Positionen die Kernlokalisation von Cdh1 negativ beeinflusst. Um diesen Punkt zu klären und um die Ergebnisse der Alanin-Mutationen zu bestätigen, wurden die Serin- oder Threoninreste der Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 in Cdh1(1-257)-GFP durch Aspartatreste ersetzt. Die negativ geladene Seitenkette dieser Aminosäure sollte eine dauerhafte Phosphorylierung an den Cdk-Motiven imitieren. Das m(4-9)D-Konstrukt war vor Beginn der Anaphase vorwiegend zytoplasmatisch, akkumulierte während der Anaphase im Zellkern und relokalierte am Ende der G1-Phase wieder im Zytoplasma (Abb. 4.6 A). Der Zeitpunkt und die Dynamik des Kerntransports von Cdh1(1-257)-m(4-9)D-GFP waren dabei identisch zu der m(4-9)A-Mutante und sehr ähnlich zur Wildtyp-Version Cdh1(1-257)-GFP (Abb. 4.7). Außerdem konnte festgestellt werden, dass die m(4-9)D-Mutation die konstitutive Kernlokalisation des m(1-3)A-Konstrukts nicht beeinträchtigte (Abb. 4.6 B). Diese Daten bekräftigen die Schlussfolgerung, dass die Phosphorylierung an den Cdk-Motiven 4-9 keinen Einfluss auf die Lokalisation von Cdh1 nimmt.

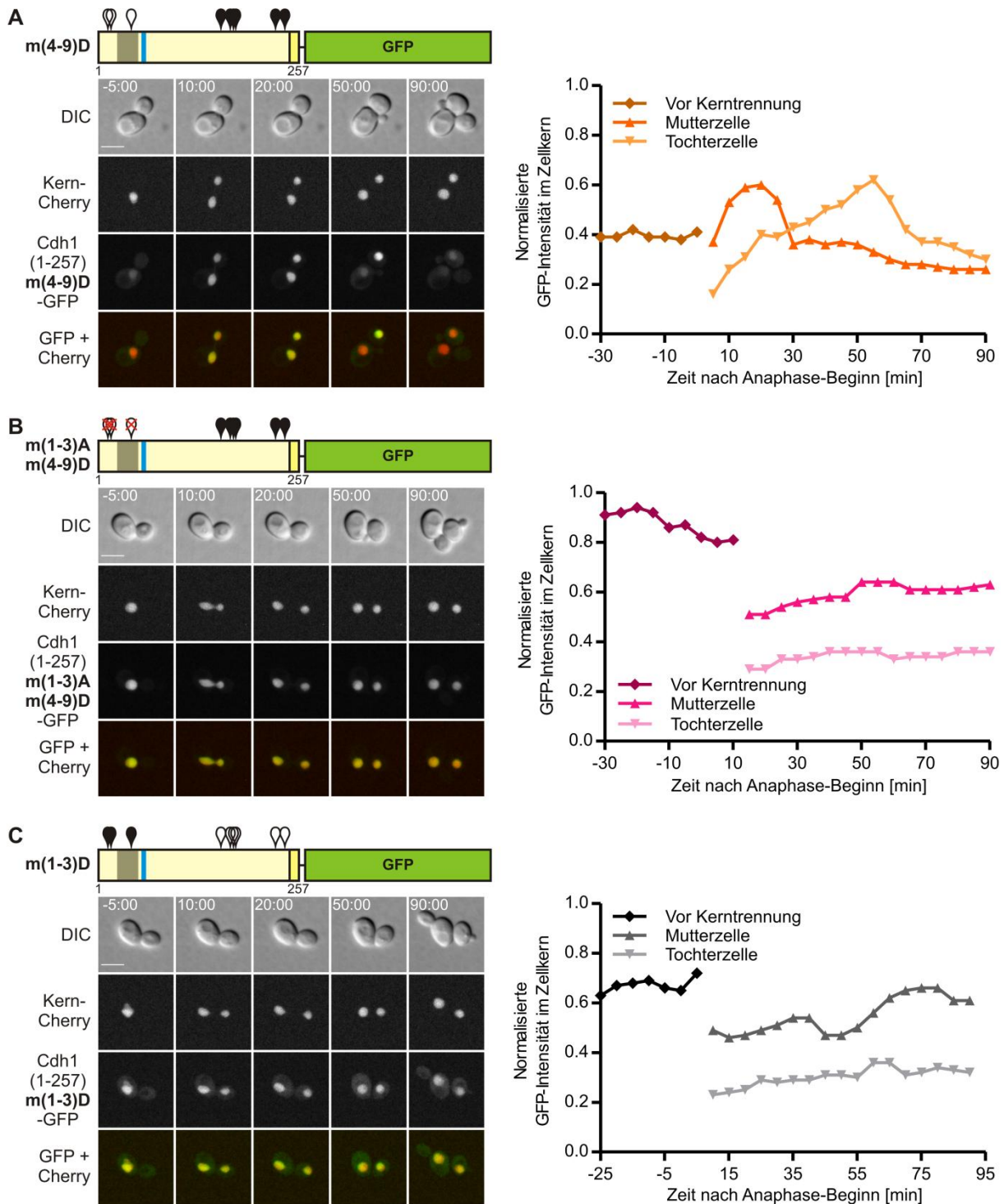


Abbildung 4.6: Nukleo-zytoplasmatischer Transport von Cdh1(1-257)-GFP bei Imitierung dauerhafter Cdk-Phosphorylierung

(A – C) Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, welche *CDH1(1-257)-m(4-9)D-GFP* (A), *CDH1(1-257)-m(1-3)A-m(4-9)D-GFP* (B) oder *CDH1(1-257)-m(1-3)D-GFP* (C) von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Es wurden über einen Zeitraum von 2 h Zeitrafferaufnahmen mit Abständen von 5 min erstellt. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Für jedes Konstrukt sind ausgewählte Zeitwerte für eine repräsentative Zelle gezeigt. Die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals im Zellkern wurde für die gezeigten Zellen wie in Abbildung 4.2 quantifiziert. Die beginnende Elongation des Zellkerns wurde als Anaphase-Beginn festgelegt und diente als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min). Zur Veranschaulichung sind schematische Darstellungen der Fusionskonstrukte gezeigt. Die NLS (oliv), die C-Box (blau) und der Beginn der

WD40-Domäne (kräftiges gelb) sind durch farbige Kästen hervorgehoben. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind mit weißen Pins markiert. Rote Kreuze kennzeichnen die Mutation von Phosphat-akzeptierenden Aminosäureresten zu Alaninresten (S/TP zu AP), während schwarze Pins die Mutation der Aminosäurereste zu Aspartatresten (S/TP zu DP) symbolisieren. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

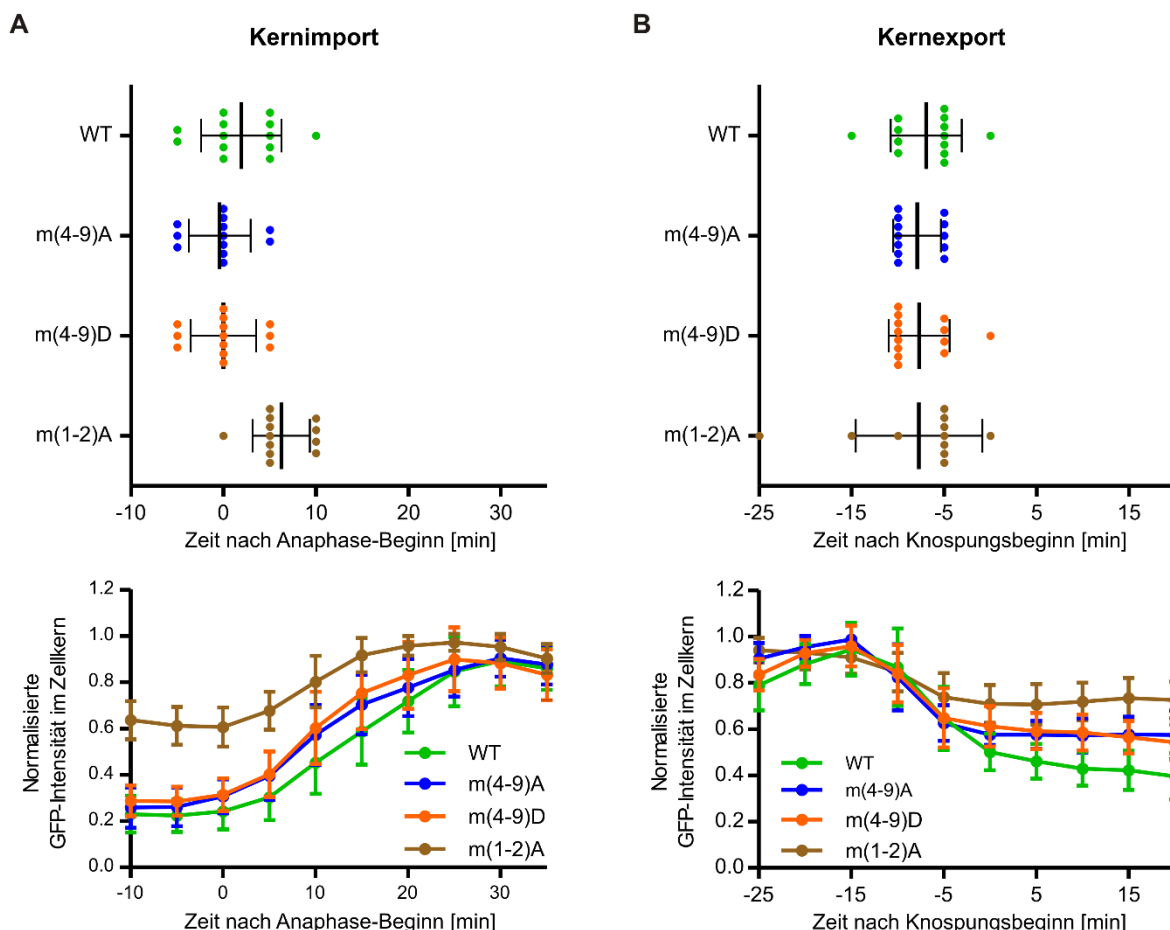


Abbildung 4.7: Quantitativer Vergleich des nukleo-zytoplasmatischen Transports von Cdh1(1-257)-GFP-Derivaten mit Mutationen in Cdk-Phosphorylierungsstellen

(A und B) Analyse der GFP-Intensität im Zellkern von Zellen, die *CDH1(1-257)-GFP* (grün), *CDH1(1-257)-m(4-9)A-GFP* (blau), *CDH1(1-257)-m(4-9)D-GFP* (orange) oder *CDH1(1-257)-m(1-2)A-GFP* (braun) von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Es wurden über einen Zeitraum von 2 h Zeitrafferaufnahmen mit Abständen von 5 min erstellt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals im Zellkern quantifiziert (Kapitel 6.4.2) und der Zeitpunkt und die Dynamik des Kernimports (A) und Kernexports (B) der Konstrukte wie in Abbildung 4.3 (B und C) bestimmt. Die Stichprobengröße betrug je $n = 13$ Zellen für Cdh1(1-257)-GFP (WT) und Cdh1(1-257)-m(4-9)D-GFP (m(4-9)D) sowie je $n = 12$ Zellen für Cdh1(1-257)-m(4-9)A-GFP (m(4-9)A) und Cdh1(1-257)-m(1-2)A-GFP (m(1-2)A). Repräsentative Zellen sind in den Abbildungen 4.2, 4.5 und 4.6 gezeigt. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

Als nächstes wurden die Phosphat-akzeptierenden Aminosäuren der Cdk-Motive 1-3 durch Aspartate substituiert, um die Auswirkung einer dauerhaften Phosphorylierung an diesen

Positionen zu untersuchen. Übereinstimmend mit der Beobachtung, dass die Cdk-Motive für einen regulierten Kerntransport intakt sein müssen, verhinderte die m(1-3)D-Mutation die wechselnde Lokalisation von Cdh1(1-257)-GFP zwischen Zellkern und Zytoplasma (Abb. 4.6 C). Anders als erwartet wies das m(1-3)D-Konstrukt ein deutliches Kernsignal auf, dessen Intensität während der Anaphase jedoch nicht zunahm (Abb. 4.6 C). Im Gegensatz zu Konstrukten, welche die m(1-3)A-Mutation tragen und nur im Zellkern nachzuweisen waren (Abb. 4.5 C und 4.6 B), zeigte die m(1-3)D-Mutante in allen Zellzyklusphasen zusätzlich zur Kernlokalisierung ein gut detektierbares Signal im Zytoplasma (Abb. 4.6 C). Daraus lässt sich einerseits schließen, dass die Aspartat-Mutationen an den Cdk-Motiven 1-3 die Phosphorylierung nur unvollständig imitieren konnten. Andererseits spricht die partielle Lokalisation im Zytoplasma dafür, dass negative Ladungen an diesen Positionen den Import von Cdh1(1-257)-GFP in den Zellkern stören.

Zusammen belegen diese Daten, dass die Kernlokalisierung von Cdh1 durch die Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 gesteuert wird. Insbesondere ihre Lage im Bereich der NLS und der störende Einfluss der m(1-3)D-Mutation auf die Kernlokalisierung lassen vermuten, dass die Phosphorylierung der Cdk-Motive 1-3 den Import von Cdh1 in den Zellkern durch Inaktivierung der NLS negativ reguliert.

4.1.4 Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 kontrollieren die Bindung von Cdh1 an den APC/C

In einer früheren Studie erhöhte die Entfernung der Cdk-Motive 4-9 die Aktivität von Cdh1 *in vivo* (Zachariae *et al.*, 1998), was auf eine wichtige, regulatorische Funktion dieser Phosphorylierungsstellen hindeutet. Da sich die Phosphorylierung der Cdk-Motive 4-9 nicht auf die Kernlokalisierung von Cdh1 auswirkte (Abb. 4.5 – 4.7), wurde als Nächstes ein möglicher Einfluss auf die Wechselwirkung mit dem APC/C überprüft. Um die Bindung verschiedener Cdh1-Derivate an den APC/C *in vivo* mittels Co-Immunpräzipitation (CoIP) zu untersuchen, wurden die hergestellten *CDH1*-Konstrukte von dem induzierbaren *GALL*-Promotor exprimiert und über ein N-terminales HA3-Epitop immunpräzipitiert. Die Zellen co-exprimierten eine endogen mit Myc9-markierte Version der APC/C-Untereinheit Cdc23, über deren Nachweis in Westernblot-Analysen die Menge an co-präzipitierten APC/C-Komplexen bestimmt werden sollte. Außerdem wurden die Proteinlevel des mitotischen Cyclins Clb2 in den Zellextrakten nachgewiesen. Daraus sollten Rückschlüsse auf die Fähigkeit der Cdh1-

Derivate, den APC/C zu aktivieren und den Abbau von Clb2 zu induzieren, gezogen werden. Um eine vergleichbare Expression der verschiedenen *CDH1*-Konstrukte zu gewährleisten, wurden die Expressionskonstrukte mit Hilfe eines speziellen Vektorsystems (Sadowski *et al.*, 2007) als eine einzelne Kopie stabil in das Genom der Zellen integriert.

Während Cdh1 in Abhängigkeit seines Phosphorylierungszustands entweder im Zytoplasma oder im Zellkern lokalisiert (Abb. 4.1 und 4.5; Jaquenoud *et al.*, 2002), kann der APC/C in allen Zellzyklusphasen im Zellkern detektiert werden (Abb. 8.3 im Anhang; Zachariae *et al.*, 1996; Jaquenoud *et al.*, 2002; Melloy und Holloway, 2004). Eine Aufhebung der räumlichen Trennung zwischen zytoplasmatischem Cdh1 und nukleärem APC/C durch Mutation der Cdk-Phosphorylierungsstellen in Cdh1 sollte sich innerhalb der Zelle auf die Interaktion des Aktivators mit dem APC/C auswirken. Dabei stellt sich die Frage, ob sich der Einfluss der Lokalisation auch in einem CoIP-Experiment ausprägt, da bei der Herstellung von Gesamtzellextrakten die zytoplasmatischen und nukleären Bestandteile gemischt werden und eine Interaktion zwischen ursprünglich zytoplasmatischem Cdh1 und nukleärem APC/C nachträglich erfolgen könnte. Um grundsätzlich zu überprüfen, inwieweit sich APC/C-Cdh1-Komplexe nach der Lyse im Zellextrakt *de novo* bilden können, sollten in einem technischem CoIP-Experiment *CDC23-MYC9* und *HA3-CDH1* getrennt in haploiden Stämmen exprimiert und die Kulturen anschließend für die Herstellung der Zellextrakte im gleichen Verhältnis gemischt werden. Als Vergleich wurden *CDC23-MYC9* und *HA3-CDH1* in einem heterozygot-diploiden Stamm co-exprimiert. Durch die Co-Expression in einem heterozygot-diploiden Stamm sollte berücksichtigt werden, dass die Bindungspartner bei getrennter Expression durch das Mischen der haploiden Stämme verdünnt werden. Als Negativkontrolle für die getrennte Expression wurde ein haploider *CDC23-MYC9*-Stamm mit einem haploiden Wildtyp-Stamm gemischt und als Kontrolle für die Co-Expression wurde ein Stamm verwendet, der heterozygot-diploid für *CDC23-MYC9* war, jedoch kein *HA3-CDH1* exprimierte.

Wenn *HA3-CDH1* und *CDC23-MYC9* getrennt exprimiert und nachträglich gemischt wurden, war das im Präzipitat von HA3-Cdh1 detektierte Signal von Cdc23-Myc9 nur unwesentlich höher als im Präzipitat der Negativkontrolle (Abb. 8.4 im Anhang, Spuren 5 und 6). Im Fall der Co-Expression von *HA3-CDH1* und *CDC23-MYC9* hob sich das Signal von Cdc23-Myc9, das mit HA3-Cdh1 co-präzipitierte, dagegen deutlich von dem Hintergrundsignal der Negativkontrolle ab (Abb. 8.4 im Anhang, Spuren 7 und 8). Aus diesen Daten lässt sich

schließen, dass nach der Lyse der Zellen nur eine geringfügige und vernachlässigbare Neubildung von APC/C-Cdh1-Komplexen im Zellextrakt stattfindet. Dies könnte durch die, relativ zu den Volumenverhältnissen in der Zelle, starke Verdünnung der Komponenten im IP-Ansatz bedingt sein. Gleichzeitig lässt sich daraus folgern, dass die in einem CoIP-Experiment detektierte Interaktion, zumindest im Fall von APC/C-Cdh1, auf Proteinkomplexe zurückgeht, die sich in der Zelle gebildet haben und während der Aufarbeitung aufrecht erhalten werden können. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich ein möglicher Einfluss der Lokalisation von Cdh1 auf die APC/C-Interaktion auch in einem CoIP-Experiment niederschlägt.

Als nächstes sollte die Rolle der verschiedenen Cdk-Phosphorylierungsstellen in Cdh1 für die Bindung an den APC/C untersucht werden. Hierzu wurden die Cdk-Motive der NTD in unterschiedlichen Kombinationen in Cdh1 voller Länge mutiert (Abb. 4.8 A) und anschließend die APC/C-Bindung der Cdh1-Derivate in Zellen untersucht, die mit dem Spindelgift Nocodazol behandelt wurden. Diese Zellen arretieren mit hoher Cdk1-Aktivität in der Metaphase, sodass eine maximale Phosphorylierung von Cdh1 zu erwarten ist. In der Tat war das heterogene Laufverhalten von HA3-Cdh1 in der SDS-PAGE unter diesen Bedingungen noch stärker ausgeprägt (Abb. 4.8 B, Spuren 2 und 9) als in asynchron wachsenden Zellen (Abb. 8.4 im Anhang), was sich im Westernblot in der Detektion von zahlreichen Banden mit hoher Signalintensität äußerte und mit einer vollständigen Phosphorylierung an multiplen Positionen im Einklang steht. Die im Präzipitat von HA3-Cdh1 detektierten Mengen an Cdc23-Myc9 waren kaum höher als der Hintergrund in der Negativkontrolle (Abb. 4.8 B, Spuren 8 und 9). Zudem hatte die Überexpression von *HA3-CDH1* in den Nocodazol-behandelten Zellen keinen nennenswerten Einfluss auf die Proteinmenge des Cyclins Clb2 (Abb. 4.8 B, Spuren 1 und 2). Dies zeigt, dass phosphoryliertes HA3-Cdh1 in Nocodazol-arretierten Zellen, wenn überhaupt, nur sehr schwach an den APC/C bindet. Mittels Fluoreszenzmikroskopie von Zellen, die Cdh1 als GFP-Fusion exprimierten, konnte zudem gezeigt werden, dass Wildtyp-Cdh1 in Nocodazol-arretierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert und nicht im Zellkern angereichert ist (Abb. 4.8 C, obere Bildreihe), während eine GFP-markierte Version der APC/C-Untereinheit Cdc23 unter diesen Bedingungen im Zellkern detektiert wurde (Abb. 4.8 D). Diese Daten belegen, dass Cdh1 in Nocodazol-arretierten Zellen in hyperphosphorylierter Form im Zytoplasma vorliegt und nicht an den APC/C gebunden ist.

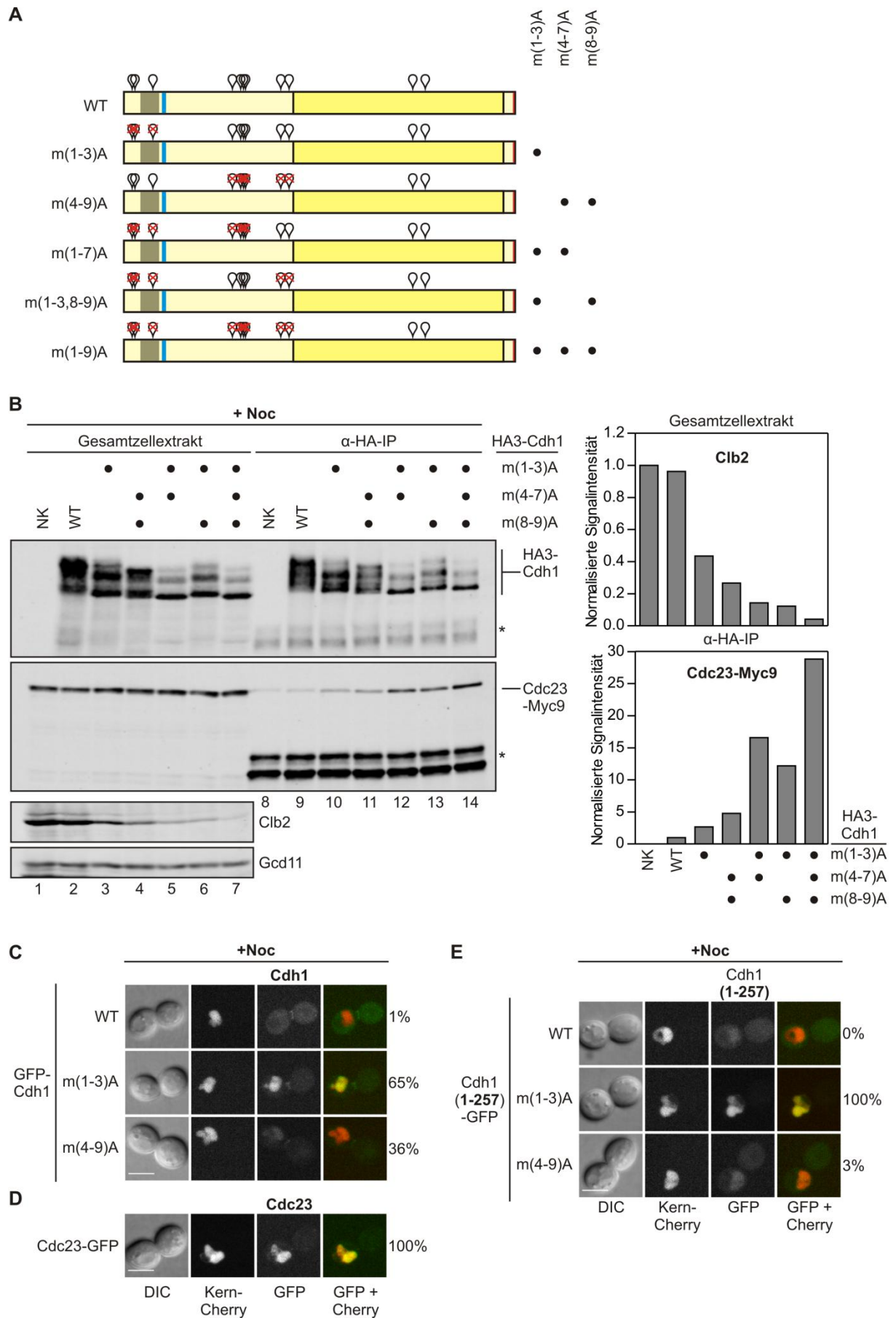


Abbildung 4.8: APC/C-Interaktion und Lokalisation von Cdh1-Derivaten in Nocodazol-arretierten Zellen

(A) Schematische Darstellung der Cdh1-Derivate. Die NLS (oliv), die C-Box (blau), die WD40-Domäne (kräftiges gelb) und das IR-Motiv (rot) sind durch farbige Kästen gekennzeichnet. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind mit weißen Pins markiert. Rote Kreuze symbolisieren die Mutation von Phosphat-akzeptierenden Aminosäureresten zu Alaninresten (S/TP zu AP). **(B)** Westernblot-Analyse zur APC/C-Interaktion von Cdh1, Cdh1-m(1-3)A, Cdh1-m(4-9)A, Cdh1-m(1-7)A, Cdh1-m(1-3, 8-9)A und Cdh1-m(1-9)A in Nocodazol-arretierten Zellen. Die Zellen wurden durch Zugabe von Nocodazol in der Metaphase arretiert und anschließend die Expression der *CDH1*-Konstrukte für 2 h von dem *GALL*-Promotor induziert. Die Zellen co-exprimierten eine endogen mit dem Myc9-Epitop markierte Version der APC/C-Untereinheit Cdc23. Nach dem Zellaufschluss wurden die Cdh1-Derivate über ein N-terminales HA3-Epitop mit Hilfe eines HA-spezifischen Antikörpers aus dem Gesamtzellextrakt immunpräzipitiert. Die Cdh1-Derivate und Cdc23-Myc9 wurden in den Gesamtzellextrakten und in den Immunpräzipitaten (α -HA-IP) mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung von HA- und Myc-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Sternchen markieren das Signal des für die IP verwendeten HA-spezifischen Antikörpers. Die Gesamtzellextrakte wurden in einer separaten Westernblot-Analyse zusätzlich auf Clb2 und Gcd11, das als Ladekontrolle diente, mit Hilfe von spezifischen Antisera untersucht. Als Negativkontrolle (NK, Spuren 1 und 8) diente ein Stamm, der *CDC23-MYC9* aber kein *HA3-CDH1*-Konstrukt exprimiert. Die Spuren 2 und 9 enthalten das Wildtyp-Konstrukt HA3-Cdh1 (WT). Die Säulendiagramme zeigen die Quantifizierung der Clb2-Signale im Gesamtzellextrakt und Cdc23-Myc9-Signale in den Immunpräzipitaten. Die Signalintensitäten von Clb2 wurden auf die Intensitäten der zugehörigen Gcd11-Signale normiert und der Wert für die Negativkontrolle gleich 1 gesetzt. Die Signalintensitäten von Cdc23-Myc9 wurde auf das entsprechende HA3-Cdh1-Signal normiert und der Wert für das Wildtyp-Konstrukt gleich 1 gesetzt. **(C – E)** Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die *CDC23-GFP* (D) oder verschiedene Derivate von *GFP-CDH1* (C) oder *CDH1(1-257)-GFP* (E) exprimierten. Vor der Mikroskopie wurden die Zellen mit Nocodazol in der Metaphase arretiert. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Für jedes Konstrukt sind repräsentative Zellen gezeigt und der Anteil an Zellen mit GFP-Signal im Zellkern ist in Prozent angegeben (Stichprobengrößen: n = 44 (Cdc23-GFP), n = 87 (GFP-Cdh1, WT), n = 43 (GFP-Cdh1, m(1-3)A), n = 39 (GFP-Cdh1, m(4-9)A), n = 63 (Cdh1(1-257)-GFP, WT), n = 42 (Cdh1(1-257)-GFP, m(1-3)A) und n = 70 Zellen (Cdh1(1-257)-GFP, m(4-9)A)). (C) Die Expression der *GFP-CDH1*-Konstrukte erfolgte von dem *MET25*-Promotor und wurde für 45 min vor der Mikroskopie in den Nocodazol-arretierten Zellen induziert. (D) Die Expression von *CDC23-GFP* erfolgte von dem endogenen Genort. (E) Die Expression der *CDH1(1-257)-GFP*-Konstrukte erfolgte von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

Um den Einfluss der Lokalisation von Cdh1 auf dessen Interaktion mit dem APC/C zu testen, wurden als Nächstes die Cdk-Motive 1-3 durch Alanin-Substitution entfernt. Wie erwartet bewirkte die m(1-3)A-Mutation, dass GFP-Cdh1 in der Mehrzahl der Nocodazol-behandelten Zellen im Zellkern lokalisierte (Abb. 4.8 C, mittlere Bildreihe). Trotz der erhöhten Kernlokalisation konnte im Präzipitat von HA3-Cdh1-m(1-3)A nur unwesentlich mehr Cdc23-Myc9 nachgewiesen werden als im Präzipitat des Wildtyp-Konstrukts (Abb. 4.8 B, Spuren 9 und 10). Somit reicht die Lokalisation von Cdh1 im Zellkern alleine nicht für eine robuste Interaktion mit dem APC/C aus. Stattdessen lassen diese Daten vermuten, dass die Bindung von kernlokalisiertem Cdh1-m(1-3)A an den APC/C durch die Phosphorylierung an den verbliebenen Cdk-Motiven verhindert wird.

Die Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 sind in der NTD von Cdh1 ungleich verteilt und häufen sich in zwei Bereichen: Während sich die Cdk-Motive 4-7 innerhalb eines Abschnitts von nur 22 Aminosäuren ab Position 157 befinden, liegen die Cdk-Motive 8 und 9 an den Positionen 227 und 240 unmittelbar vor der WD40-Domäne (Abb. 4.8 A). Um die Bedeutung dieser Phosphorylierungsstellen für die Interaktion mit dem APC/C zu klären, wurden die beiden Gruppen von Cdk-Motiven entweder einzeln oder zusammen in Cdh1-m(1-3)A mutiert. Sowohl die m(4-7)A- als auch die m(8-9)A-Mutation verbesserte die APC/C-Bindung der m(1-3)A-Mutante. So banden die betreffenden Konstrukte Cdh1-m(1-7)A und Cdh1-m(1-3,8-9)A gleichermaßen mehr Cdc23-Myc9 als die m(1-3)A-Mutante (Abb. 4.8 B, Spuren 10, 12 und 13). Eine maximale Interaktion von Cdh1 mit dem APC/C wurde beobachtet, wenn alle neun Cdk-Motive in der NTD von Cdh1 mutiert wurden (Abb. 4.8 B, Spur 14). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung sowohl an den Cdk-Motiven 4-7 als auch an den Cdk-Motiven 8-9 die Wechselwirkung mit dem APC/C stört und die simultane Phosphorylierung beider Gruppen additiv auf die APC/C-Interaktion wirkt. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Entfernung der Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 die Bindung von Cdh1 an den APC/C nur dann wesentlich erhöhte, wenn die Motive 1-3 ebenfalls mutiert wurden. So enthielt das Präzipitat der m(4-9)A-Mutante, die noch an den Cdk-Motiven 1-3 phosphoryliert werden kann, deutlich weniger Cdc23-Myc9 als das Präzipitat des m(1-9)A-Konstrukts (Abb. 4.8 B, Spuren 11 und 14). Da Cdh1-m(4-9)A in der Mehrzahl der Nocodazol-arretierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert war (Abb. 4.8 C, untere Bildreihe), lässt sich aus diesen Daten folgern, dass eine Lokalisation von Cdh1 im Zellkern notwendig für die Bindung an den APC/C ist.

Der Nachweis der Clb2-Level in den Zellextrakten zeigte, dass die Fähigkeit der Cdh1-Derivate, die Degradation von Clb2 zu induzieren, weitestgehend mit der Intensität ihrer APC/C-Bindung korrelierte (Abb. 4.8 B). Obwohl die Konstrukte Cdh1-m(1-3)A und Cdh1-m(4-9)A nur schwach mit dem APC/C-Kernkomplex interagierten, reduzierte ihre Überexpression die Proteinmenge von Clb2 um mehr als die Hälfte. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindung geringer Mengen Cdh1 bereits ausreicht, um die Degradation von Clb2 einzuleiten. Die erhöhte Fähigkeit von Cdh1-m(1-3)A und Cdh1-m(4-9)A, den APC/C zu aktivieren, spiegelte sich auch in dem Wachstumsdefekt wider, den diese Konstrukte bereits bei geringer Expression hervorriefen (Abb. 8.2 B im Anhang). Die ektopische Aktivierung des APC/C und die resultierende, negative Rückkopplung auf die Aktivität von Cdk1 kann als Erklärung dafür dienen, warum die Konstrukte in voller Länge weniger

einheitlich in Nocodazol-arretierten Zellen lokalisierten (Abb. 4.8 C) als die entsprechenden Cdh1(1-257)-Konstrukte (Abb. 4.8 E). Da für die Cdh1(1-257)-GFP-Derivate keine robuste Interaktion mit dem APC/C nachgewiesen werden konnte (Abb. 8.5 im Anhang), ist es unwahrscheinlich, dass diese Konstrukte den APC/C gegen B-Typ-Cycline aktivieren und die Cdk1-Aktivität in Nocodazol-arretierten Zellen beeinflussen.

Die negative Rückkopplung der Cdh1-Derivate auf die Aktivität von Cdk1 hat zudem Auswirkungen auf die Ergebnisse der ColP-Experimente. Es ist davon auszugehen, dass mit zunehmender Entfernung der Phosphorylierungsstellen sowohl die Phosphorylierung an verbliebenen Cdk-Motiven in Cdh1 als auch die Phosphorylierung aller übrigen Cdk1-Substrate abnimmt. Dadurch lässt sich einerseits der individuelle Beitrag der Phosphorylierungsstellen schwerer bestimmen und andererseits können weitere Einflussgrößen, wie beispielsweise eine Abnahme der Phosphorylierung des APC/C, als Ursachen für die reduzierte APC/C-Cdh1-Interaktion nicht ausgeschlossen werden.

Um der negative Rückkopplung der *CDH1*-Derivate auf die Cdk1-Aktivität entgegenzuwirken, wurde das ColP-Experiment mit Zellen wiederholt, die zusätzlich zur endogenen Kopie eine stabilisierte Version des Cyclins Clb2 von dem *GAL1-10*-Promotor exprimierten. Dabei handelte es sich um ein Clb2-Konstrukt, dem durch eine interne Deletion der Aminosäuren 17-33 die D-Box an Position 25 entfernt wurde (Clb2-Δdb; Schwab *et al.*, 1997). Anders als endogenes Clb2, dessen Level durch die Überexpression von *CDH1*-Derivaten mit Mutationen in den Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 weiterhin reduziert wurden, war das stabilisierte Clb2-Δdb-Konstrukt in allen Zellextrakten robust zu detektieren (Abb. 4.9 B). Dadurch betrug die Gesamtmenge an Clb2 selbst in Zellen, die das *CDH1-m(1-9)A*-Konstrukt exprimierten, noch mehr als das Zweifache der endogenen Clb2-Menge in den Kontrollzellen, die kein *HA3-CDH1*-Konstrukt enthielten (Abb. 4.9 B, Spuren 1 und 7, und Quantifizierung). Wie erwartet konnte auch unter diesen Bedingungen keine nennenswerte APC/C-Bindung für das Wildtyp-Konstrukt beobachtet werden, da sich das Signal von Cdc23-Myc9 in dem Präzipitat von HA3-Cdh1 kaum von dem Signal der Negativkontrolle abhob (Abb. 4.9 B, Spuren 8 und 9). Das Ermöglichen der Kernlokalisierung von HA3-Cdh1 durch Einführen der m(1-3)A-Mutation erhöhte die Co-Präzipitation von Cdc23-Myc9 ebenfalls nicht (Abb. 4.9 B, Spur 10).

exprimierte. Die Spuren 2 und 9 enthalten das Wildtyp-Konstrukt HA3-Cdh1 (WT). Die Sternchen markieren das Signal des für die IP verwendeten HA-spezifischen Antikörpers. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

Anders als im Experiment ohne Co-Expression von *CLB2-Δdb* (Abb. 4.8) wurde die APC/C-Interaktion von Cdh1-m(1-3)A nur geringfügig verbessert, wenn die Phosphorylierungsstellen 4-7 oder 8-9 zusätzlich inaktiviert wurden (Abb. 4.9). So wurde in den Präzipitaten der resultierenden Konstrukte Cdh1-m(1-7)A und Cdh1-m(1-3,8-9)A nur unwesentlich mehr Cdc23-Myc9 detektiert als in dem Präzipitat der m(1-3)A-Mutante (Abb. 4.9, Spuren 10, 12 und 13). Eine deutliche Zunahme der APC/C-Bindung konnte lediglich dokumentiert werden, wenn die Cdk-Motive 1-3, 4-7 und 8-9 simultan mutiert wurden, um die m(1-9)A-Mutante herzustellen (Abb. 4.9, Spur 14). Waren dagegen die Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 intakt und lediglich die Phosphorylierungsstellen 4-9 inaktiviert, interagierte das entsprechende m(4-9)A-Konstrukt nur schwach mit dem APC/C (Abb. 4.9, Spur 11). Somit wurden die Ergebnisse des vorangegangenen Experiments grundsätzlich bestätigt, wobei die Rolle der Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 präziser aufgelöst werden konnte.

In Anwesenheit hoher Mengen Clb2 zeigte sich, dass sowohl die Phosphorylierung an den Cdk-Motiven 4-7 als auch an den Cdk-Motiven 8-9 alleine hinreichend ist, um die Bindung von nukleärem Cdh1-m(1-3)A an den APC/C zu blockieren. Folglich war die intermediäre Zunahme der APC/C-Interaktion im Fall der Konstrukte Cdh1-m(1-7)A und Cdh1-m(1-3,8-9)A in dem vorangegangenen Experiment ohne Co-Expression von *CLB2-Δdb* (Abb. 4.8) der negativen Rückkopplung auf die Cdk1-Aktivität geschuldet, die vermutlich zu einer Verringerung der Phosphorylierung an den verbliebenen Cdk-Motiven geführt hatte. Die robuste Interaktion von Cdh1-m(1-9)A mit dem APC/C in Gegenwart hoher Mengen Clb2, und daraus resultierend hoher Cdk1-Aktivität, zeigt zudem, dass Cdk1 die APC/C-Cdh1-Interaktion vor allem durch die Phosphorylierung von Cdh1 und nicht durch Phosphorylierung des APC/C kontrolliert.

Um den Befund, dass die Bindung von Cdh1 an den APC/C durch die Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 gesteuert wird, weiter zu festigen, wurden zur Nachahmung dauerhafter Phosphorylierung die Phosphat-akzeptierenden Threonin- und Serinreste an diesen Positionen durch Aspartatreste ersetzt (Abb. 4.10 A) und die Interaktion mit dem APC/C in asynchron wachsenden Zellen analysiert.

Anders als in Nocodazol-Extrakten co-präzipitierte eine substantielle Menge an Cdc23-Myc9 mit HA3-Cdh1 in Extrakten der asynchron wachsenden Kultur, welche nicht-phosphoryliertes Cdh1 aus Zellen der G1-Phase und späten Mitose enthalten (Abb. 4.10 B, Spur 9). Damit übereinstimmend führte die Überexpression von *HA3-CDH1* in asynchroner Kultur zu einer Verringerung der Clb2-Level um etwa 50%. Die Phospho-mimetische Mutation der Cdk-Motive 4-9 verhinderte dagegen die Interaktion mit dem APC/C, da das Signal für Cdc23-Myc9 im Präzipitat des m(4-9)D-Konstrukts nicht höher als das Hintergrundsignal in der Negativkontrolle war (Abb. 4.10 B, Spuren 8 und 10).

Im Gegensatz dazu verbesserte die Entfernung der Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 durch Alanin-Substitutionen die Bindung von Cdh1 an den APC/C (Abb. 4.10 B, Spuren 9 und 11). Die m(4-9)D- und m(4-9)A-Mutationen wirkten sich im Kontext des konstitutiv im Kern lokalisierten m(1-3)A-Konstrukts ähnlich aus. Während Cdc23-Myc9 im Präzipitat von HA3-Cdh1-m(1-3)A gefunden wurde, konnte die APC/C-Untereinheit im Präzipitat des m(1-3)A-m(4-9)D-Konstrukts nicht über Hintergrundniveau detektiert werden (Abb. 4.10 B, Spuren 12 und 13). Umgekehrt erhöhte die zusätzliche Entfernung der Cdk-Motive 4-9 durch Alanin-Substitutionen die Bindung von Cdh1-m(1-3)A an den APC/C (Abb. 4.10 B, Spuren 12 und 14). Da sich die m(4-9)D-Mutation weder auf den regulierten Kerntransport von Cdh1(1-257)-GFP noch auf die konstitutive Kernlokalisation von Cdh1(1-257)-m(1-3)A-GFP auswirkte (Abb. 4.6), kann eine fehlerhafte Lokalisation als Ursache für den Bindungsdefekt der m(4-9)D-Konstrukte ausgeschlossen werden. Vielmehr unterstützen diese Daten die Vorstellung, dass die Phosphorylierung der Cdk-Motive 4-9 die Bindung von Cdh1 an den APC/C inhibiert. Trotz der deutlich reduzierten APC/C-Bindung konnte die Überexpression von m(4-9)D-Derivaten die Degradation von Clb2 induzieren (Abb. 4.10 B, Spuren 3 und 6). Dies deutet darauf hin, dass der Austausch zu Aspartat die Phosphorylierung an den Cdk-Motiven nicht in vollem Umfang imitieren kann.

Ebenso wie in Nocodazol-arretierten Zellen (Abb. 4.8 B und 4.9 B) förderte eine Verstärkung der Kernlokalisation durch die Entfernung der Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 die Bindung von Cdh1 an den APC/C kaum (Abb. 4.10 B, Spuren 9 und 12). Allerdings verbesserte die m(1-3)A-Mutation die Fähigkeit von Cdh1-m(4-9)A, mit dem APC/C zu interagieren (Abb. 4.10, Spuren 11 und 14) und die Degradation von Clb2 zu vermitteln (Abb. 4.10, Spuren 4 und 7). Dies unterstützt die Sichtweise, dass sich Cdh1 für die Wechselwirkung mit dem APC/C im Zellkern befinden muss.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Cdk-Phosphorylierungsstellen in der NTD von Cdh1 in autonomen Gruppen organisiert sind, welche die Aktivität von Cdh1 auf unterschiedliche Weise steuern. Während die Cdk-Motive 1-3 die Lokalisation von Cdh1 im Zellkern regulieren, kontrollieren die Phosphorylierungsstellen 4-9 die Bindung von Cdh1 an den APC/C.

4.2 Regulation von Cdc20 durch APC/C-Cdh1 vermittelte Instabilität

In der vielschichtigen Regulation des frühen Aktivators Cdc20 nimmt die Proteindegradation eine zentrale Rolle ein. Cdc20 ist in allen Zellzyklusphasen instabil und wird über multiple Mechanismen degradiert (Prinz *et al.*, 1998; Pfleger und Kirschner, 2000; Reis *et al.*, 2006; Robbins und Cross, 2010a; Foe *et al.*, 2011; Foster und Morgan, 2012; Uzunova *et al.*, 2012). In der späten Mitose trägt die APC/C-Cdh1 vermittelte Degradation von Cdc20 entscheidend zur Inaktivierung der Cdc20-gebundenen APC/C-Isoform bei und begünstigt gleichzeitig den Wechsel der Aktivatoren von Cdc20 zu Cdh1. In *S. cerevisiae* basiert die Erkennung von Cdc20 durch APC/C-Cdh1 auf zwei RxxL-Motiven in der NTD von Cdc20 (Prinz *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998; Robbins und Cross, 2010a), die der minimalen Konsensussequenz einer D-Box entsprechen (Glutzer *et al.*, 1991). Jedoch ist der individuelle Beitrag dieser Motive zur Instabilität umstritten (Prinz *et al.*, 1998; Robbins und Cross, 2010a). Um mehr über die Erkennung von Cdc20 durch den APC/C-Cdh1 zu lernen, war ein Ziel dieser Arbeit, die minimale Abbausequenz (Degron) für die APC/C-Cdh1-vermittelte Degradation von Cdc20 zu identifizieren.

4.2.1 Die N-terminalen 80 Aminosäuren von Cdc20 sind hinreichend für Kernlokalisierung und APC/C-Cdh1-abhängige Instabilität in der G1-Phase

Um herauszufinden, welche Elemente in Cdc20 für die Instabilität in der G1-Phase notwendig sind, wurden durch Verkürzung Subfragmente von Cdc20 hergestellt und auf ihre Stabilität hin untersucht. In einem ersten Test sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden, in welchen Zellzyklusphasen die hergestellten Konstrukte nachweisbar sind. Dadurch sollten Rückschlüsse auf die Stabilität der Konstrukte gezogen werden und gleichzeitig mögliche Lokalisationselemente identifiziert werden. Cdc20 kann ähnlich wie Cdh1 in eine CTD, welche die charakteristische WD40-Domäne enthält, und eine NTD mit

regulatorischen Sequenzelementen unterteilt werden (Abb. 4.11 A). Zunächst sollte das Lokalisationsmuster der NTD und CTD mit dem Lokalisationsmuster von Cdc20 in voller Länge verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden sowohl Cdc20 als auch seine Subdomänen mit GFP fusioniert (Abb. 4.11 B) und unter die Kontrolle des konstitutiven *TEF2*-Promotors gestellt.

Im Gegensatz zu nicht-fusioniertem GFP (Abb. 4.1 C) wies GFP-Cdc20 ein deutliches Signal im Zellkern von knospenden Zellen auf, wie aus der Co-Lokalisation mit dem Kern-Cherry-Konstrukt ersichtlich wurde (Abb. 4.11 C, Bildreihen 2 und 3). Dagegen konnte GFP-Cdc20 trotz konstitutiver Expression nicht in Zellen der G1-Phase detektiert werden (Abb. 4.11 C, Bildreihe 1). Dies steht im Einklang mit der bekannten Instabilität von Cdc20 in der G1-Phase (Prinz *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998; Robbins und Cross, 2010a) und deutet gleichzeitig auf eine besonders starke Degradation in dieser Phase des Zellzyklus hin. Abgesehen von der Abwesenheit in der G1-Phase konnten keine Änderungen der Lokalisation im Verlauf des Zellzyklus beobachtet werden, was mit Aussagen früherer Arbeiten übereinstimmt (Shirayama *et al.*, 1998; Jaquenoud *et al.*, 2002).

Anders als Cdc20 in voller Länge lokalisierte GFP-Cdc20(243-610), das die CTD von Cdc20 enthält, nicht nur im Zellkern, sondern war zusätzlich im Zytoplasma angereichert (Abb. 4.11 D). Darüber hinaus konnte in Zellen mit Knospe, die sich nicht in der Anaphase befanden, ein schwaches GFP-Signal am Knospenhals beobachtet werden (Abb. 4.11 D, Pfeil). Somit ähnelte die Lokalisation der CTD von Cdc20 stark der zellulären Verteilung der CTD von Cdh1 (Abb. 4.1 D) und es kann angenommen werden, dass das Lokalisationsmuster von GFP-Cdc20(243-610) ebenfalls durch Wechselwirkungen mit APC/C-Substraten beeinflusst ist. Eine weitere Besonderheit war, dass das GFP-Signal des CTD-Konstrukts auch in Zellen der G1-Phase nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.11 D). Das GFP-Signal wies in G1 eine ähnlich hohe Intensität wie in den übrigen Zellzyklusphasen auf, was bedeutet, dass GFP-Cdc20(243-610) in dieser Zellzyklusphase stabil ist. Im Gegensatz dazu verhielt sich das NTD-umfassende Cdh1(1-248)-GFP bezüglich Stabilität und Lokalisation identisch zu GFP-Cdc20 in voller Länge, da es sich in knospenden Zellen exklusiv im Zellkern befand (Abb. 4. 11 E, Bildreihen 2 und 3), aber in Zellen der G1-Phase nicht zu detektieren war (Abb. 4.11 E, Bildreihe 1). Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass die NTD notwendig und hinreichend für die exklusive Lokalisation im Zellkern sowie für die Instabilität von Cdc20 in der G1-Phase ist.

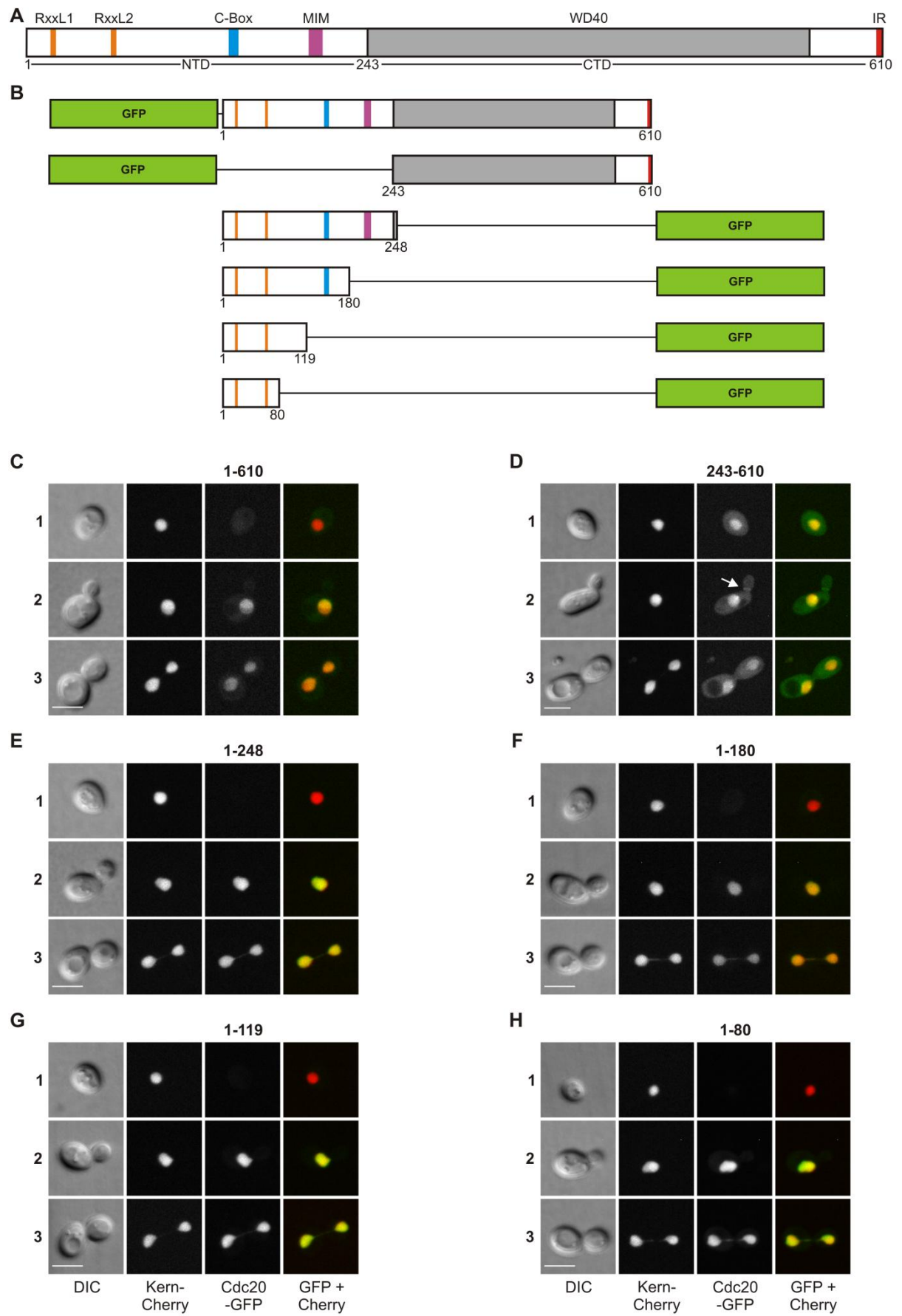


Abbildung 4.11: Lokalisation und Stabilität von Cdc20 und verkürzten Derivaten im Zellteilungszyklus

(A) Schematische Darstellung von Cdc20. Die RxxL-Motive (orange), die C-Box (blau), das Mad2-Interaktionsmotiv (MIM, magenta), die WD40-Domäne (grau) und das IR-Motiv (rot) sind mit farbigen Kästen gekennzeichnet. Die Zahlen geben Aminosäurepositionen an. NTD: N-terminale Domäne. CTD: C-terminale Domäne. **(B)** Schematische Darstellung der Cdc20-GFP-Fusionskonstrukte basierend auf A. **(C – H)** Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die *GFP-CDC20* (C), *GFP-CDC20(243-610)* (D), *CDC20(1-248)-GFP* (E), *CDC20(1-180)-GFP* (F), *CDC20(1-119)-GFP* (G) oder *CDC20(1-80)-GFP* (H) von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Für jedes Konstrukt sind repräsentative Zellen gezeigt, die sich in der G1-Phase (Bildreihe 1), vor der Anaphase (Bildreihe 2) oder in der späten Anaphase befinden (Bildreihe 3). Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast.

Um die verantwortlichen Regionen für Kernlokalisation und Degradation in der G1-Phase weiter einzugrenzen, wurde die NTD von ihrem C-terminalen Ende ausgehend sukzessiv verkürzt und die resultierenden Fragmente wurden für die anschließende Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie mit GFP fusioniert (Abb. 4.11 B). Ebenso wie die längeren NTD-Konstrukte Cdc20(1-180)-GFP (Abb. 4.11 F) und Cdc20(1-119)-GFP (Abb. 4.11 G) zeigte Cdc20(1-80)-GFP, das lediglich die N-terminalen 80 Aminosäuren einschließlich der zwei RxxL-Motive umfasst, ein prominentes Signal im Zellkern von knospenden Zellen, jedoch kein Signal in Zellen der G1-Phase (Abb. 4.11 H). In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Entfernung der N-terminalen 65 Aminosäuren sowohl zu einer Stabilisierung als auch zu einer reduzierten Kernlokalisation von Cdc20 führt (Höckner, 2011). In der Summe zeigen diese Daten, dass Cdc20(1-80) nicht nur für den Abbau von Cdc20 in der G1-Phase verantwortlich ist, sondern darüber hinaus eine NLS enthält, die einen wesentlichen Beitrag zur Kernlokalisation des Proteins leistet.

Um die Degradation von Cdc20(1-80)-GFP weiter zu charakterisieren, wurde die Stabilität des Fusionsproteins im Verlauf des Zellzyklus mittels Zeitrafferaufnahmen verfolgt. Dazu wurden Zellen, die *CDC20(1-80)-GFP* konstitutiv von dem *TEF2*-Promotor exprimierten, über einen Zeitraum von zwei Stunden in 5-minütigen Abständen aufgenommen und anschließend die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals quantifiziert.

Zu Beginn der Anaphase konnte ein intensives GFP-Signal im Zellkern detektiert werden (Zeitpunkt 0 min in Abb. 4.12 A). Im Verlauf der Kerntrennung stieg die Intensität des Gesamtsignals an, bis die Zellkerne ihren maximalen Abstand erreichten (Zeitwert 20 min in Abb. 4.12, A und B). Bevor die Mitosespindel zusammenbrach und sich die Verbindung zwischen den Zellkernen auflöste (zwischen 20 min und 30 min in Abb. 4.12), verringerte sich

die gemessene GFP-Intensität zunächst langsam und nahm ab dem Zeitpunkt des Abknickens der Knospe (Zeitwert 50 min in Abb. 4.12) mit zunehmenden Raten ab.

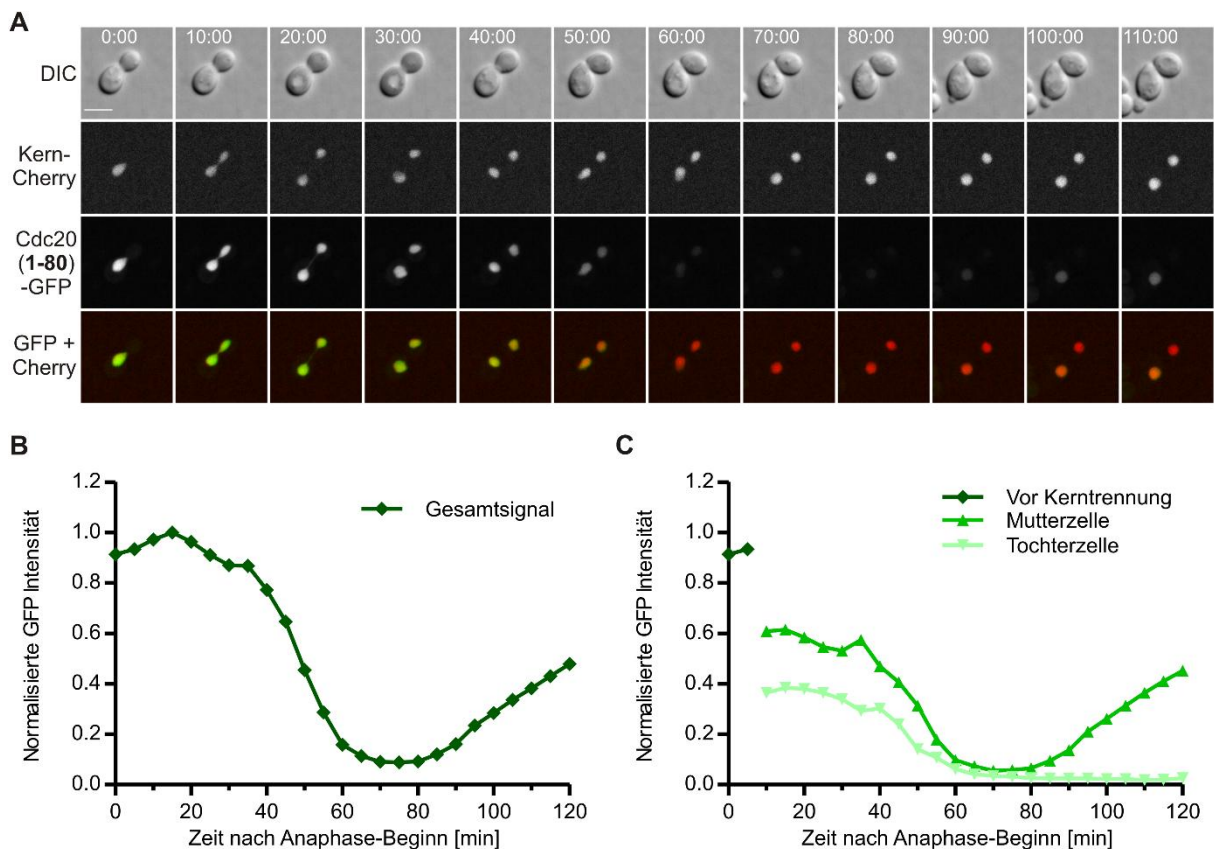


Abbildung 4.12: Fluktuation von Cdc20(1-80)-GFP im Zellteilungszyklus

(A) Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die *CDC20(1-80)-GFP* von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Es wurden Zeitrafferaufnahmen über einen Zeitraum von 2 h und mit Abständen von 5 min erstellt. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Die beginnende Elongation des Zellkerns wurde als Anaphase-Beginn festgelegt und diente als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min). Es sind ausgewählte Zeitwerte für eine repräsentative Zelle gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **(B und C)** Quantifizierung des GFP-Signals der in A gezeigten Zelle. Die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals wurde gemessen, auf den Maximalwert des Gesamtsignals normiert und gegen die Zeit aufgetragen. Das Gesamtsignal (B) setzt sich nach der Kernetrennung aus den Signalen von Mutter und Tochterzelle (C) zusammen.

Die GFP-Signale in Mutter- und Tochterzelle sanken dabei in vergleichbarem Maße (Abb. 4.12 C) und erreichten 20 min nach Abtrennung der Knospe ein Minimum in der G1-Phase (Zeitwert 70 min in Abb. 4.12). Zeitgleich mit der Bildung einer neuen Knospe stieg das GFP-Signal im Zellkern der Mutterzelle wieder an (Zeitwert 90 min in Abb. 4.12), wogegen das Signal in der Tochterzelle, die während der Aufnahme nicht in einen neuen Zellzyklus eintrat, auf niedrigem Niveau verblieb. Aus der Fluktuation des GFP-Signals lässt sich schließen, dass

der Abbau von Cdc20(1-80)-GFP in der späten Anaphase beginnt und bis zum Ende der G1-Phase andauert.

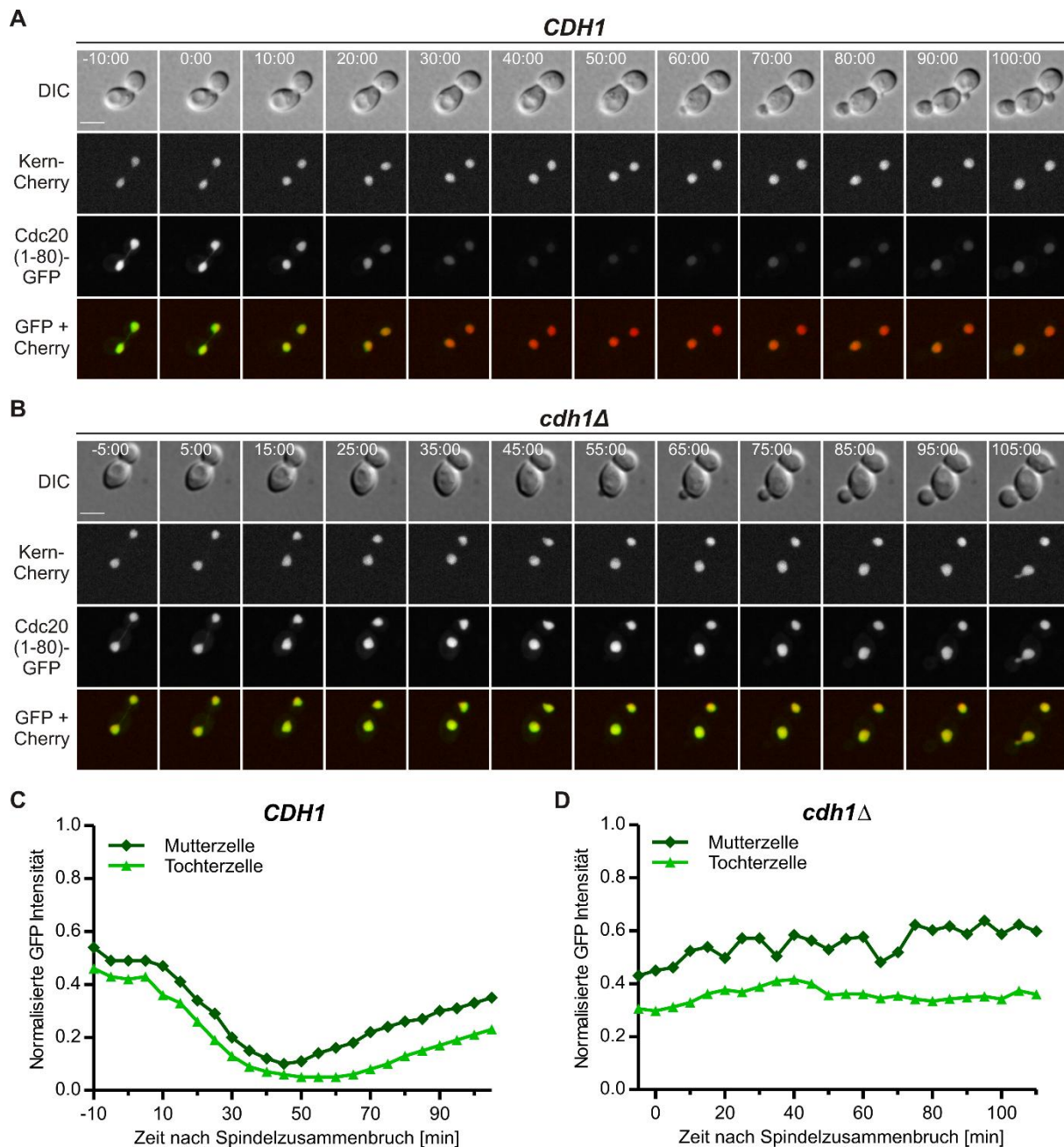


Abbildung 4.13: Rolle von Cdh1 für die Fluktuation von Cdc20(1-80)-GFP im Zellteilungszyklus

(A und B) Fluoreszenzmikroskopie von Wildtyp-Zellen (*CDH1*, A) und Zellen mit Deletion des *CDH1*-Gens (*cdh1Δ*, B), die *CDC20(1-80)-GFP* von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Es wurden über einen Zeitraum von 2h Zeitrafferaufnahmen in 5-minütigen Abständen erstellt und ausgewählte Zeitwerte sind für jeweils eine repräsentative Zelle gezeigt. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Der Zusammenbruch der Mitosespindel wurde als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min) ausgewählt und an Hand des Abstands zwischen den trennenden Zellkernen bestimmt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **(C und D)** Quantifizierung des GFP-Signals für die in A gezeigte *CDH1*- (C) und die in B gezeigte *cdh1Δ*-Zelle (D). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf den Maximalwert des Gesamtsignals, das sich aus der Summe der

Signalintensitäten von Mutter- und Tochterzelle ergibt, normiert und gegen die Zeit aufgetragen. Verändert nach Arnold *et al.*, 2015.

Die Zeitspanne der Instabilität, die sich von der späten Mitose bis zum Ende der G1-Phase erstreckte, lässt vermuten, dass Cdc20(1-80)-GFP durch APC/C-Cdh1 für den Abbau markiert wird. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde die Stabilität des Fusionsproteins in Zellen, in denen das *CDH1*-Gen deletiert wurde (*cdh1Δ*), mittels Zeitrafferaufnahmen untersucht und mit der Stabilität in Wildtyp-Zellen verglichen. Anders als in Wildtyp-Zellen, in denen das GFP-Signal in bekannter Weise fluktuierte (Abb. 4.13 A und C), nahm die Signalintensität von Cdc20(1-80)-GFP in *cdh1Δ*-Zellen während der späten Mitose und der folgenden G1-Phase nicht ab, sondern blieb sowohl in Mutter- als auch in Tochterzellen auf einem hohem Niveau (Abb. 4.13 B und D). Zudem verringerten sich die gemessenen Fluoreszenzintensitäten weder in Wildtyp- noch in *cdh1Δ*-Zellen in dem Zeitraum vor der Anaphase (Abb. 8.6 im Anhang), sodass ein möglicher Beitrag des frühen Aktivators Cdc20 zur Degradation von Cdc20(1-80)-GFP ausgeschlossen werden kann. Somit handelt es sich bei Cdc20(1-80) um ein Degron, das ausschließlich durch APC/C-Cdh1 erkannt wird.

4.2.2 Eine D-Box und eine NLS sind essentielle Bestandteile des Cdc20(1-80)-Degrons

Als nächstes sollten in Cdc20(1-80) die Abbausignale, die für die Erkennung des Degrons durch Cdh1 notwendig sind, bestimmt werden. Hierzu wurden Verkürzungen und mutierte Versionen des Degrons hergestellt und als GFP-Fusion unter Kontrolle des regulierbaren *GAL1*-Promotors gestellt. Um die Stabilität dieser Derivate in der G1-Phase zu untersuchen, wurde die Expression der Konstrukte für zwei Stunden in Zellen induziert, die zuvor mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase arretiert wurden. Nach Abschalten der Expression wurde die Stabilität der Degron-Derivate in Westernblot-Analysen verfolgt. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte über ein N-terminales Myc3-Epitop. Durch Messung des DNA-Profiles der Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde sichergestellt, dass der Arrest in der G1-Phase für die Dauer des Experiments vollständig war. Zudem wurde im Vorfeld die Expression der *CDC20-GFP*-Konstrukte in asynchron wachsenden Zellen überprüft, um die Interpretation der Stabilitätsmessungen zu erleichtern (Abb. 8.7 im Anhang). Zusätzlich zu den Stabilitätsmessungen wurde die Lokalisation der Derivate in asynchron wachsenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

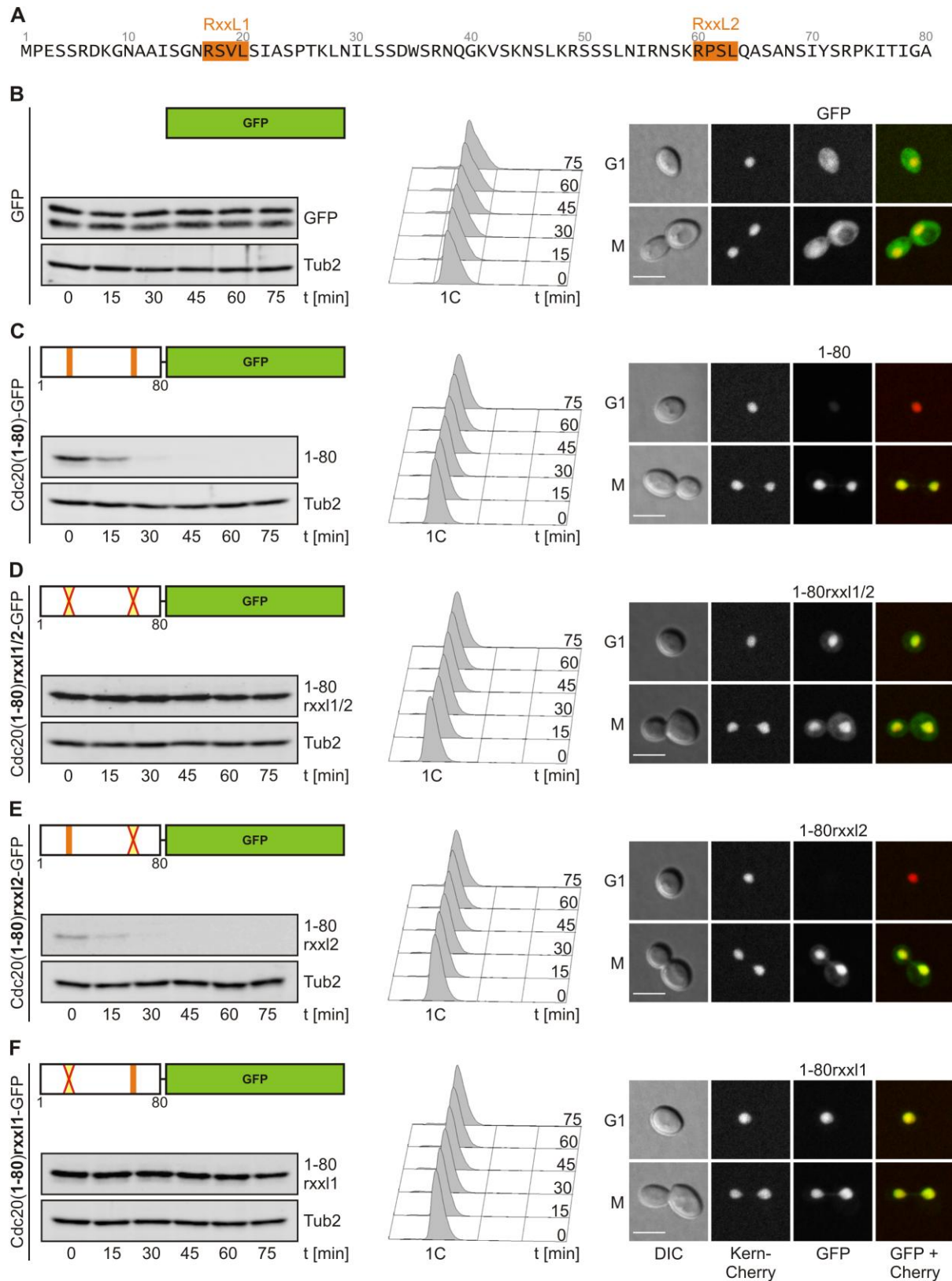


Abbildung 4.14: Bedeutung der RxL-Motive des Cdc20(1-80)-Degrons für die Instabilität in der G1-Phase

(A) Sequenz der N-terminalen 80 Aminosäuren von Cdc20 aus *S. cerevisiae*. Die Positionen der RxL-Motive sind durch orange Kästen gekennzeichnet. Die Zahlen definieren Aminosäurepositionen. (B – F) Stabilität in der G1-Phase und Lokalisation von GFP (B), Cdc20(1-80)-GFP (C), cdc20(1-80)rxxl1/2-GFP (D), cdc20(1-80)rxxl2-GFP (E) und cdc20(1-80)rxxl1-GFP (F). Für die Stabilitätsmessungen wurden die Zellen mit α -Faktor in der G1-Phase arretiert und anschließend die Expression der GFP-Konstrukte von dem *GAL1*-Promotor für 2 h induziert. Nach

Abschalten der Expression durch Glukose ($t = 0$ min) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und sowohl Proteinrohextrakte für die Westernblot-Analyse (links) hergestellt als auch Zellen mit Sytox-Green für die Messung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie (Mitte) gefärbt (1C: einfacher DNA-Gehalt). Der Nachweis der GFP-Konstrukte im Westernblot erfolgte über ein N-terminales Myc3-Epitop mit Hilfe eines Myc-spezifischen Antikörpers. Als Ladekontrolle wurde Tubulin (Tub2) mit einem spezifischen Antiserum detektiert. Über den Westernblot-Abbildungen sind schematische Darstellungen der Konstrukte gezeigt. Die orangenen Kästen kennzeichnen die RxxL-Motive und rote Kreuze symbolisieren deren Inaktivierung durch Alanin-Mutagenese (RxxL zu AxxA). Die Zahlen geben Aminosäurepositionen an. Für die Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen (rechts) wurde die Expression der GFP-Konstrukte von dem *GAL1*-Promotor vorab für 1 h in asynchron wachsenden Zellen induziert, welche zusätzlich das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns exprimierten. Es sind repräsentative Zellen der G1-Phase (obere Bildreihe) und der Mitose (untere Bildreihe) gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. Verändert nach Arnold *et al.*, 2015.

Als Kontrolle wurde zunächst nicht-fusioniertes GFP untersucht, das in G1-arretierten Zellen stabil war und ein vergleichbares Signal in Zellen der G1-Phase als auch in Zellen der Anaphase aufwies (Abb. 4.14 B). Dagegen konnte für Cdc20(1-80)-GFP eine hohe Instabilität in der G1-Phase dokumentiert werden. Zum einen akkumulierte Cdc20(1-80)-GFP in G1-arretierten Zellen in geringerem Ausmaß als in asynchron wachsenden Zellen (Abb. 8.8 im Anhang). Zum anderen war die Proteinmenge von Cdc20(1-80)-GFP in G1-arretierten Zellen bereits 15 min nach Abschalten der Expression deutlich reduziert und konnte nach 30 min nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.14 C). Damit übereinstimmend zeigte Cdc20(1-80)-GFP ein robustes Signal im Zellkern von mitotischen Zellen, aber war trotz Überexpression kaum in Zellen der G1-Phase zu detektieren (Abb. 4.14 C).

Das Cdc20(1-80)-Degron enthält beide RxxL-Motive der NTD (Abb. 4.14 A), denen in früheren Arbeiten unterschiedliche Bedeutung für die Degradation in der G1-Phase zugewiesen wurde. Während in einer Studie berichtet wurde, dass der Abbau von Cdc20 in der G1-Phase nur durch das erste RxxL-Motiv (RxxL1, beginnend ab Position 17) vermittelt wird (Prinz *et al.*, 1998), konnte in weiteren Studien auch für das zweite Motiv (RxxL2, beginnend ab Position 60) ein Beitrag zur Instabilität nachgewiesen werden (Shirayama *et al.*, 1998; Robbins und Cross, 2010a). Um die Rolle der RxxL-Motive für die Degradation von Cdc20 zu klären, wurden die RxxL-Motive sowohl in Kombination als auch separat durch Austausch der konservierten Arginin- und Leucinreste durch Alaninreste mutiert (AxxA).

Die Mutation beider RxxL-Motive führte zu einer deutlichen Stabilisierung des Fusionsproteins in der G1-Phase, sodass das resultierende Konstrukt cdc20(1-80)-rxxl1/2-GFP in Zellen der G1-Phase und der Mitose gleichermaßen detektiert werden konnte (Abb. 4.14 D). Neben der Lokalisation im Zellkern wies cdc20(1-80)-rxxl1/2-GFP, im Gegensatz zu

dem Wildtyp-Konstrukt, zusätzlich ein Signal im Zytoplasma auf (Abb. 4.14 D). Da Cdc20(1-80)-GFP in asynchron wachsenden Zellen stärker exprimiert wird als die rxl1/2-Mutante (Abb. 8.7 im Anhang), kann eine verstärkte Expression als Ursache für die veränderte Lokalisation des rxl1/2-Konstrukts ausgeschlossen werden. Vielmehr deutet dies darauf hin, dass die Mutation der RxxL-Motive neben der Stabilität auch die Lokalisation von Cdc20(1-80)-GFP beeinflusst. Die Mutation des zweiten RxxL-Motivs alleine bewirkte keine Stabilisierung in der G1-Phase, da cdc20(1-80)rxl2-GFP, trotz eines robusten Signals in asynchron wachsenden Zellen (Abb. 8.7 im Anhang), in G1-arretierten Zellen kaum akkumulierte und sehr rasch nach Abschalten der Expression verschwand (Abb. 4.14 E). Entsprechend konnte das rxl2-Konstrukt mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht in Zellen der G1-Phase detektiert werden (Abb. 4.14 E). Interessanterweise lokalisierte die rxl2-Mutante in Zellen außerhalb der G1-Phase ebenso wie die rxl1/2-Mutante nicht nur im Zellkern, sondern war auch im Zytoplasma nachzuweisen (Abb. 4.14 E). Daraus lässt sich ableiten, dass das RxxL2-Motiv einen Beitrag zur exklusiven Lokalisation von Cdc20(1-80)-GFP im Zellkern leistet. Im Gegensatz zur Mutation von RxxL2 war die Entfernung von RxxL1 ausreichend, um die Degradation von Cdc20(1-80)-GFP in G1-arretierten Zellen zu verhindern (Abb. 4.14 F). Dadurch war das stabilisierte rxl1-Konstrukt nicht nur in mitotischen, sondern auch in G1-Zellen zu detektieren und wies dabei ein exklusives Signal im Zellkern auf (Abb. 4.14 F). Da das erste RxxL-Motiv sowohl hinreichend als auch notwendig für die Degradation von Cdc20(1-80)-GFP in der G1-Phase war, kann gefolgert werden, dass RxxL1 Bestandteil einer funktionellen D-Box ist, die für die Erkennung durch APC/C-Cdh1 essentiell ist.

Auf Grund der Beobachtung, dass das zweite RxxL-Motiv (RxxL2) verzichtbar für die Instabilität in der G1-Phase ist, wurden C-terminale Verkürzungen des Cdc20(1-80)-Degrons hergestellt, um die minimal notwendige Abbausequenz weiter einzugrenzen. Die Deletion der Aminosäuren 70-80 blieb ohne nennenswerten Einfluss auf die Instabilität des Fusionsproteins, da das resultierende Cdc20(1-69)-GFP-Konstrukt, das noch beide RxxL-Motive enthält, in G1-arretierten Zellen einem zügigen Abbau unterlag (Abb. 4.15 A). Allenfalls konnte ein, im Vergleich zu Cdc20(1-80)-GFP, leicht erhöhtes Signal im Zytoplasma von Anaphase-Zellen detektiert werden, was auf eine unvollständige Lokalisation von Cdc20(1-69)-GFP im Zellkern hinweist (Abb. 4.15 A).

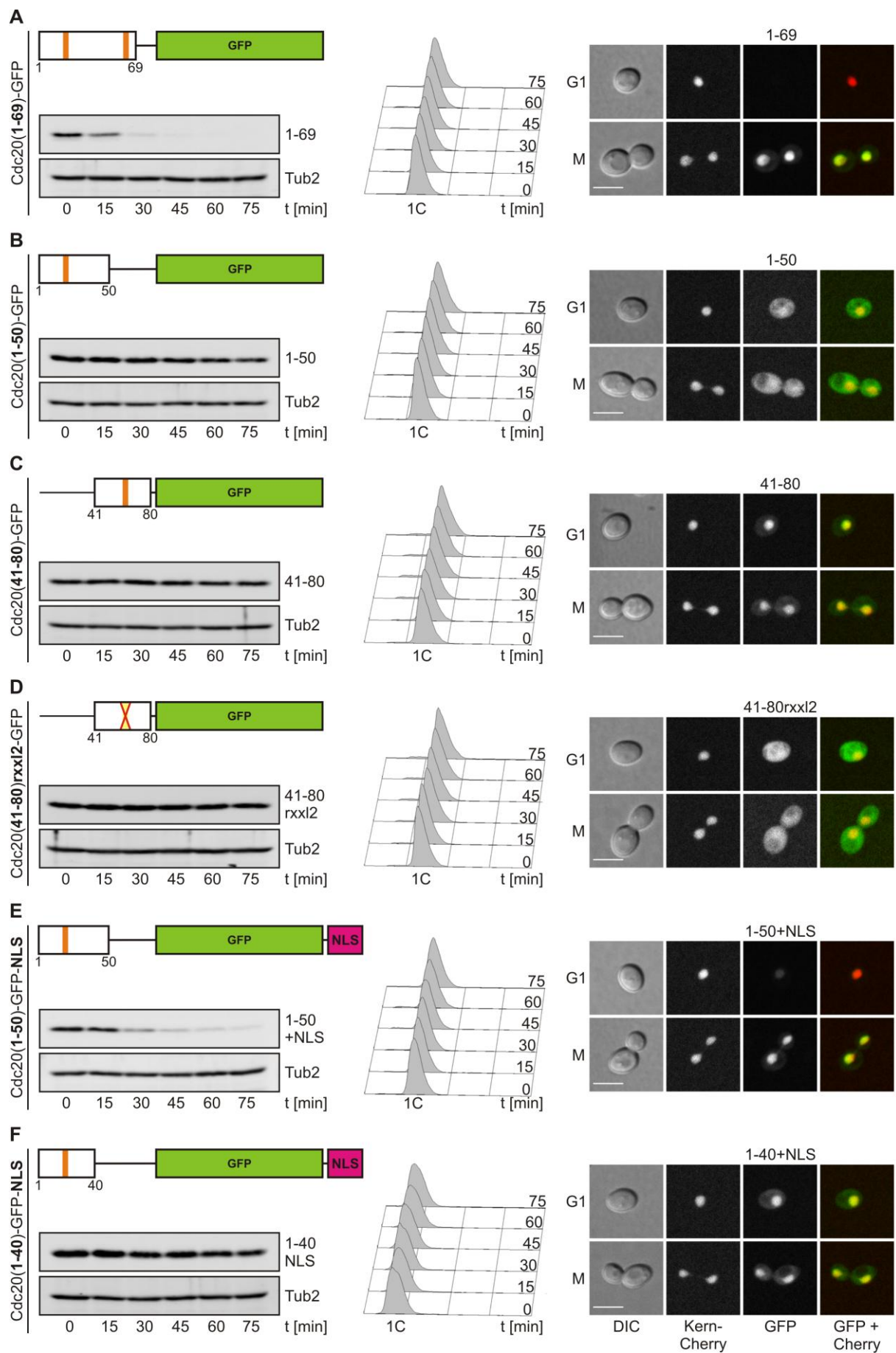


Abbildung 4.15: Notwendige Sequenzelemente des Cdc20(1-80)-Degrons für die Instabilität in der G1-Phase

(A – F) Stabilität in der G1-Phase und Lokalisation von Cdc20(1-69)-GFP (A), Cdc20(1-50)-GFP (B), Cdc20(41-80)-GFP (C), cdc20(41-80)rxxl2-GFP (D), Cdc20(1-50)-GFP+NLS (E) und Cdc20(1-40)-GFP+NLS (F). Die Stabilitätsmessungen, die Bestimmung des DNA-Gehalts und die Fluoreszenzmikroskopie wurden wie in Abbildung 4.14 B – F beschrieben durchgeführt. Über den Westernblot-Abbildungen sind schematische Darstellungen der Konstrukte gezeigt. Die orangenen Kästen kennzeichnen die RxxL-Motive und das rote Kreuz symbolisiert die Inaktivierung von RxxL2 durch Alanin-Mutagenese (RxxL zu AxxA). Im Vergleich zu Cdc20(1-80) deletierte Regionen sind durch schwarze Linien markiert. Die Zahlen geben Aminosäurepositionen an. Das 1C-Signal in den DNA-Profilen (Mitte) repräsentiert Zellen mit einfachem DNA-Gehalt. Es sind repräsentative Zellen der G1-Phase (obere Bildreihe) und der Mitose (untere Bildreihe) gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. Verändert nach Arnold *et al.*, 2015.

Eine weitere Verkürzung des Degrons auf die ersten 50 Aminosäuren, wodurch das RxxL2-Motiv entfernt wurde, führte zu einer deutlichen Stabilisierung des Proteins, sodass Cdc20(1-50)-GFP auch 75 min nach Abschalten der Expression in G1-arretierten Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.15 B). Die Verkürzung hatte zudem einen weitestgehenden Verlust der Kernlokalisierung zur Folge, da Cdc20(1-50)-GFP sowohl in Zellen der Mitose als auch in Zellen der G1-Phase hauptsächlich im Zytoplasma lokalisierte (Abb. 4.15 B). Daraus lässt sich schließen, dass der deletierte Bereich essentielle Elemente für die Lokalisation des Degrons im Zellkern enthält. In der Tat befand sich das Konstrukt Cdc20(41-80)-GFP, das die C-terminale Hälfte des Degrons umfasst, vorwiegend im Zellkern (Abb. 4.15 C). Dies bestätigt das Vorhandensein einer bisher unbekannten NLS in dem Cdc20(41-80)-Segment. Das Cdc20(41-80)-GFP-Konstrukt erwies sich als stabil in G1-arretierten Zellen und konnte sowohl in Zellen der G1-Phase als auch in Zellen der Anaphase mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Abb. 4.15 C). Somit ist dieser Bereich nicht hinreichend, um Instabilität in der G1-Phase zu vermitteln. Interessanterweise verhinderte die Mutation von RxxL2 die Kernlokalisierung von Cdc20(41-80)-GFP nahezu vollständig (Abb. 4.15 D). Daraus lässt sich schließen, dass das RxxL2-Motiv eine wichtige Komponente der neu identifizierten NLS ist. Da sich die rxxl2-Mutation im Kontext des vollständigen Cdc20(1-80)-Degrons weniger stark auswirkte (Abb. 4.14 D und E), scheinen Sequenzen innerhalb der Aminosäuren 1-40 die Kernlokalisierung ebenfalls zu unterstützen, ohne hinreichend dafür zu sein.

Die konstitutive Lokalisation des APC/C im Zellkern sowie die Zellzyklus-abhängige Kernlokalisierung von Cdh1 während der späten Mitose und der G1-Phase (Kapitel 4.1) lassen vermuten, dass die Ubiquitinierung durch den APC/C-Cdh1 vorwiegend im Zellkern stattfindet. Somit könnte die beobachtete Stabilisierung von Cdc20(1-50)-GFP in der G1-

Phase durch die überwiegend zytoplasmatische Lokalisation des Konstrukts bedingt sein. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde eine heterologe, von dem Transkriptionsfaktor Swi5 abgeleitete NLS an das C-terminale Ende von Cdc20(1-50)-GFP fusioniert, wodurch das Konstrukt Cdc20(1-50)-GFP+NLS entstand. Mit Hilfe der heterologen NLS konnte die Lokalisation des Fusionsproteins im Zellkern wiederhergestellt werden (Abb. 4.15 E). Gleichzeitig war Cdh1(1-50)-GFP+NLS wieder weitgehend instabil in der G1-Phase (Abb. 4.15 E). Um auszuschließen, dass die NLS-Fusion unbekannte Abbausignale enthält und an sich destabilisierend wirkte, wurde die NLS als Kontrolle mit nicht-fusioniertem GFP verknüpft. Da das resultierende GFP+NLS-Konstrukt in G1-arretierten Zellen stabil war (Abb. 8.9 A im Anhang), kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass Cdc20(1-50)-GFP hinreichend für Cdh1-vermittelte Degradation ist, sofern es sich im Zellkern befindet. Dies deutet darüber hinaus an, dass Kernlokalisierung eine wichtige Voraussetzung für die Instabilität des Cdc20-Degrans in der G1-Phase ist.

Zur weiteren Kartierung der minimalen Abbausequenz wurde Cdc20(1-50) um weitere 10 Aminosäuren verkürzt. Ebenso wie Cdc20(1-50)-GFP lokalisierte das kürzere Cdc20(1-40)-GFP vornehmlich im Zytoplasma und war nahezu stabil in G1-arretierten Zellen (Abb. 8.9 B im Anhang). Durch Fusion der heterologen NLS konnte zwar die fehlerhafte Lokalisation Cdc20(1-40)-GFP im Zytoplasma behoben werden, allerdings wurde dadurch nicht wie im Fall von Cdc20(1-50)-GFP die Degradation in der G1-Phase verbessert (Abb. 4.15 F). Stattdessen war das überwiegend im Zellkern lokalisierte Cdc20(1-40)-GFP+NLS in G1-arretierten Zellen stabil (Abb. 4.15 F), was bedeutet, dass sich innerhalb der Aminosäuren 40-50 wichtige Elemente für den Cdh1-vermittelten Abbau des Cdc20-Degrans befinden.

In der Summe belegen diese Daten, dass das Cdc20-Degron eine einzelne D-Box enthält, die für die Erkennung durch APC/C-Cdh1 verantwortlich ist. Ein weiteres notwendiges Element des Degrons ist eine NLS, die durch Lokalisation des Degrons im Zellkern den Abbau in der G1-Phase unterstützt.

4.2.3 Das Cdc20(1-80)-Degron ist im Nukleoplasma maximal instabil

Die Deletion der internen NLS führte zu einer Fehllokalisierung des Cdc20-Degrans im Zytoplasma und bewirkte gleichzeitig eine Stabilisierung des Konstrukts in der G1-Phase (Abb. 4.15 B). Interessanterweise konnte mit Hilfe einer heterologen NLS nicht nur die Kernlokalisierung, sondern auch die Instabilität in der G1-Phase wieder hergestellt werden

(Abb. 4.15 E). Dies lässt den Schluss zu, dass sich das Cdc20-Degron für die APC/C-Cdh1 vermittelte Degradation im Zellkern befinden muss. Um diese Interpretation zu untermauern, sollte die Kernlokalisation von Cdc20(1-80)-GFP verhindert werden und der Einfluss auf die Stabilität des Degron-Konstrukts getestet werden. Hierzu wurde das Kernexportsignal (NES, *nuclear export signal*) des Exportfaktors Nmd3, der an dem Kernexport der 60S-Untereinheit der Ribosomen beteiligt ist (Gadal *et al.*, 2001), an das C-terminale Ende von Cdc20(1-80)-GFP fusioniert. Das entstandene Konstrukt Cdc20(1-80)-GFP+NES lokalisierte in allen Zellzyklusphasen im Zytoplasma und schien vom Zellkern weitgehend ausgeschlossen (Abb. 4.16 A). Dies zeigt, dass der Export durch die Nmd3-NES stärker als der Import durch die natürliche NLS in Cdc20(1-80) ist. Zudem war Cdc20(1-80)-GFP+NES in G1-arretierten Zellen erheblich stabilisiert (Abb. 4.16 A). Dagegen wurde die Degradation von Cdc20(1-80)-GFP durch die C-terminale Fusion der Swi5-NLS nicht beeinträchtigt (Abb. 4.16 B), wodurch ein stabilisierender Effekt durch die Veränderung des C-Terminus von Cdc20(1-80)-GFP ausgeschlossen werden kann. Diese Daten erhärten den Befund, dass die APC/C-Cdh1 vermittelte Degradation von Cdc20(1-80)-GFP im Zellkern stattfindet.

Sowohl in humanen Zellen als auch in Hefezellen konnte eine lokale Anreicherung des APC/C am Kinetochor und, zumindest in humanen Zellen, am Chromatin beobachtet werden (Topper *et al.*, 2002; Melloy und Holloway, 2004). Dies wirft die Frage auf, ob die Aktivität von APC/C-Cdh1 innerhalb des Zellkerns auf Grund von lokalen Konzentrationsunterschieden variiert. Um diese Frage zu beantworten, sollte mit Hilfe geeigneter Proteinfusionen die Lokalisation von Cdc20(1-80)-GFP in bestimmten Subkompartimenten des Zellkerns erhöht werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob der Abbau des Degron-Konstrukts in der G1-Phase durch die veränderte Lokalisation beeinflusst wird.

Zunächst wurde Cdc20(1-80)-GFP mit den Histonen H1 und H2B verknüpft, um zu überprüfen, ob die APC/C-Cdh1 vermittelte Degradation am Chromatin höher als im Nukleoplasma ist. Die entstandenen Fusionsproteine wurden sowohl mit dem Kern-Cherry-Konstrukt als auch mit dem Histonmarker H2A-3mCherry co-exprimiert, um einen möglichen Einfluss der Histonfusionsanteile auf die Lokalisation überprüfen zu können. Die H1-Fusion war ähnlich wie der Zellkernmarker Kern-Cherry im gesamten Zellkern verteilt (Abb. 8.10 A im Anhang) und wies ein weitläufigeres Signal als H2A-γEmRFP auf (Abb. 4.16 C).

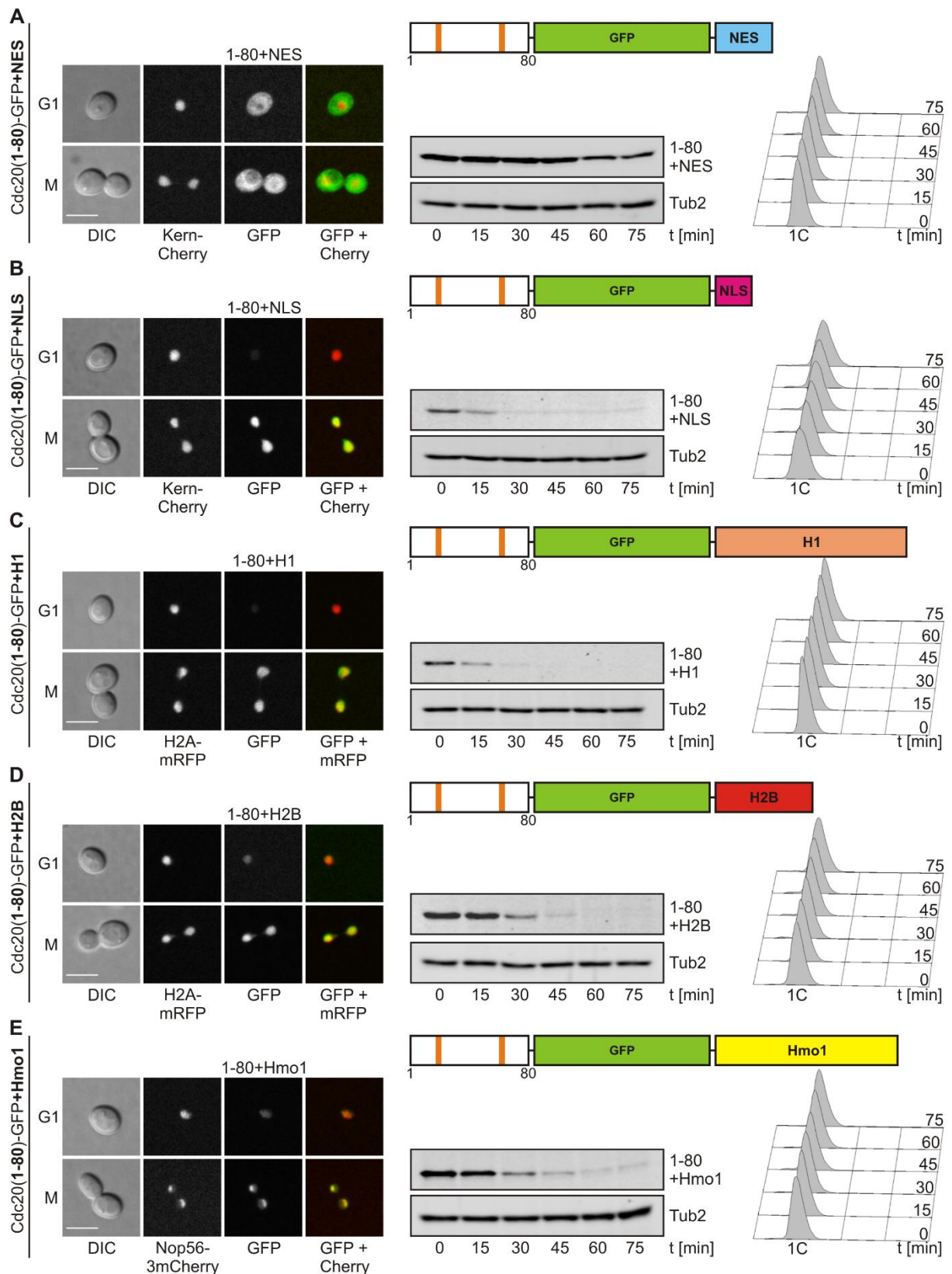


Abbildung 4.16: Einfluss der subzellulären Lokalisation auf die Instabilität des Cdc20(1-80)-Degrons in der G1-Phase

(A – E) Lokalisation und Stabilität in der G1-Phase von Cdc20(1-80)-GFP+**NES** (A), Cdc20(1-80)-GFP+**NLS** (B), Cdc20(1-80)-GFP+**H1** (C), Cdc20(1-80)-GFP+**H2B** (D) und Cdc20(1-80)-GFP+**Hmo1** (E). Die Fluoreszenzmikroskopie, die Stabilitätsmessungen und die Bestimmung des DNA-Gehalts wurden wie in Abbildung 4.14 B – F beschrieben durchgeführt. Für die Fluoreszenzmikroskopie (links) wurden Zellen

verwendet, die entweder das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns (A und B), H2A-mRFP zur Visualisierung des Histon-Oktamers (C und D) oder Nop56-3mCherry zur Visualisierung des Nukleolus (E) co-exprimierten. Es sind repräsentative Zellen der G1-Phase (obere Bildreihe) und der Mitose (untere Bildreihe) gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. Über den Westernblot-Abbildungen sind schematische Darstellungen der Konstrukte gezeigt. Die orangenen Kästen kennzeichnen die RxxL-Motive und die Zahlen geben Aminosäurepositionen an. Das 1C-Signal in den DNA-Profilen (rechts) repräsentiert Zellen mit einfachem DNA-Gehalt. Verändert nach Arnold *et al.*, 2015.

Dagegen co-lokalisierte die H2B-Fusion mit H2A-yEmRFP in einer kompakteren Struktur (Abb. 4.16 D), die eine geringere Ausdehnung im Zellkern als Kern-Cherry zeigte (Abb. 8.10 B im Anhang). Dieses Lokalisationsmuster steht im Einklang mit der Organisation der Histonproteine im Chromatin, da das Histon H2B als Bestandteil des Histon-Oktamers den Kern der Nukleosomen bildet und kompakt im Chromatin eingebunden ist, während das Linker-Histon H1 im Gegensatz dazu eine lockere Assoziation mit dem Chromatin aufweist. Cdc20(1-80)-GFP+H1 war in G1-arretierten Zellen ähnlich instabil wie das nicht-fusionierte Cdc20(1-80)-GFP (Abb. 4.14 C und 4.16 C), wohingegen die Degradation in der G1-Phase durch die H2B-Fusion etwas verringert wurde, sodass Cdc20(1-80)-GFP+H2B 15 min nach Abschaltung der Expression noch ein robustes Signal im Westernblot zeigte, das erst nach 30 min sichtlich schwächer wurde (Abb. 4.16 D). Daraus lässt sich ableiten, dass die Aktivität von APC/C-Cdh1 am Chromatin nicht erhöht ist. Im Gegenteil scheint die Einbindung von Cdc20(1-80)-GFP in das Histon-Oktamer die Effizienz der APC/C-Cdh1 vermittelten Degradation zu verringern.

Ein weiteres Subkompartiment des Zellkerns ist der Nukleolus, der sich um die ribosomale DNA bildet und wichtige Funktionen in der Ribosomenbiogenese übernimmt (Boisvert *et al.*, 2007). Um die Aktivität von APC/C-Cdh1 im Nukleolus zu messen, wurde Cdc20(1-80)-GFP mit dem HMG-Box-Protein Hmo1 fusioniert, das an ribosomale DNA bindet (Merz *et al.*, 2008; Wittner *et al.*, 2011). Cdc20(1-80)-GFP+Hmo1 co-lokalisierte überwiegend mit dem nukleolären Protein Nop56 (Abb. 4.16 E), das an der Prozessierung der ribosomalen RNA im Nukleolus beteiligt ist (Tschochner und Hurt, 2003) und mit Hilfe einer 3mCherry-Fusion visualisiert wurde. Zusätzlich zur Lokalisation im Nukleolus wies das Hmo1-Fusionskonstrukt noch ein schwaches Signal im umgebenden Nukleoplasma auf (Abb. 4.16 E und Abb. 8.10 C im Anhang). Die Stabilitätsmessungen ergaben, dass der Abbau von Cdc20(1-80)-GFP+Hmo1 in G1-arretierten Zellen im Vergleich zu nicht-fusioniertem Cdc20(1-80)-GFP reduziert war (Abb. 4.14 C und 4.16 E). Dies deutet daraufhin, dass Cdc20(1-80)-GFP durch die Lokalisation im Nukleolus stabilisiert wurde.

Zusammengefasst führen diese Beobachtungen zu der Schlussfolgerung, dass der durch APC/C-Cdh1 vermittelte Abbau von Cdc20(1-80)-GFP maximal ist, wenn das Degron-Konstrukt frei zugänglich im Nukleoplasma vorliegt.

4.2.4 Die Instabilität des Cdc20(1-80)-Degrons könnte durch Cdk1-Phosphorylierung reguliert sein

Der Abbaubeginn von APC/C-Substraten wird in erster Linie durch die kontrollierte Aktivierung des APC/C im Zellteilungszyklus bestimmt. In manchen Fällen wird der Zeitpunkt des Abbaus jedoch zusätzlich durch post-translationale Modifikation des Substrats reguliert. So wird der Replikationsfaktor Cdc6 in humanen Zellen durch Phosphorylierung an Cdk-Phosphorylierungsstellen, die sich neben APC/C-Erkennungssignalen befinden und die Ubiquitinierung durch APC/C-Cdh1 verhindern, stabilisiert (Mailand und Diffley, 2005). In *S. cerevisiae* hemmt die Phosphorylierung der Substrate Pds1 (Securin) und Dbf4 durch Cdk1 in der Nähe ihrer Abbausignale die Ubiquitinierung durch APC/C-Cdc20, wodurch der Abbaubeginn der beiden Proteine *in vivo* reguliert wird (Holt *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2014). Interessanterweise befindet sich in Cdc20 von *S. cerevisiae* eine potentielle Cdk-Phosphorylierungsstelle (SPTK ab Position 24) unmittelbar C-terminal des RxxL1-Motivs (Abb. 4.17 A), das als D-Box und essentielles Abbausignal des Cdc20-Degrons identifiziert wurde (Abb. 4.14). Um zu überprüfen, ob der Abbaubeginn von Cdc20 durch die Phosphorylierung in der Nähe der D-Box beeinflusst wird, wurde die potentielle Cdk-Phosphorylierungsstelle in Cdc20(1-80)-GFP durch Mutation des Serinrests zu einem Alaninrest (S24A) entfernt. Zusätzlich wurde der Serinrest durch einen Aspartatrest (S24D) ausgetauscht, wodurch konstitutive Phosphorylierung an dieser Position imitiert werden sollte. Anschließend wurde die Stabilität der verschiedenen Derivate im Zellzyklus mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Hierzu wurden die Konstrukte vom konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimiert und Zeitrafferaufnahmen mit 5-minütigen Abständen über einen Zeitraum von zwei Stunden erstellt. Die Fluoreszenzintensitäten der detektierten GFP-Signale wurden quantifiziert und der Beginn der Kerntrennung als zeitlicher Bezugspunkt zur Normalisierung der Zeitachsen einzelner Abbaukurven ausgewählt, um die verschiedenen Derivate hinsichtlich des Zeitpunkts und der Kinetik ihres Abbaus vergleichen zu können. Zunächst wurde der Abbau von Cdc20(1-80)-GFP näher charakterisiert. Wie aus der Analyse des Gesamtsignals für Mutter- und Tochterzelle ersichtlich wurde, stieg die Proteinmenge

von Cdc20(1-80)-GFP bis zur Anaphase an und schwankte in den 25 min vor Beginn der Anaphase um einen Maximalwert (Abb. 4.17 E). Der Abbau von Cdc20(1-80)-GFP setzte schließlich im Mittel 14,5 min (\pm 15,4 min) nach Beginn der Kerntrennung ein (Abb. 4.17 E und F). Mutterzellen weisen in vielen Fällen nur eine kurze G1-Phase auf und treten schneller in den nächsten Zellzyklus ein als Tochterzellen (Abb. 4.17 B). Zum Teil bildeten Mutterzellen bereits 5 min nach der Zelltrennung eine neue Knospe und das Cdc20(1-80)-GFP-Signal verringerte sich auf Grund der sehr kurzen G1-Phase kaum. Dadurch waren die für Mutterzellen kalkulierten Abbaukurven (Abb. 8.11 A im Anhang) wesentlich inhomogener als die Abbaukurven, die für Tochterzellen erstellt wurden (Abb. 8.11 B im Anhang). So nahm das GFP-Signal in einigen Mutterzellen kaum ab, während in anderen Mutterzellen eine ähnlich starke Degradation wie in Tochterzellen beobachtet werden konnte (Abb. 8.11 A im Anhang). Daher wurde für weitere statistische Auswertungen die Degradation in Tochterzellen herangezogen, in denen die gemittelte Signalintensität von Cdc20(1-80)-GFP bis auf ein Fünftel des Maximalwerts sank (Abb. 4.17 G). Der Zeitpunkt des Abbaubeginns von Cdc20(1-80)-GFP lag in Tochterzellen mit 20,6 min (\pm 5,3 min) etwas höher als der Wert, der für das Gesamtsignal errechnet werden konnte (Abb. 4.17 E und H). Diese Abweichung kann dadurch erklärt werden, dass im Zuge der Kerntrennung das Kernvolumen des entstehenden Tochter-Zellkerns zunächst zunimmt, wodurch der eigentliche Abbaubeginn in der Tochterzelle möglicherweise überdeckt wird.

Als weiterer Parameter zur Charakterisierung des Abbaus wurde außerdem der Zeitwert bestimmt, an dem die gemessene Signalintensität erstmals weniger als die Hälfte des Maximalwerts betrug. Dies war für Cdc20(1-80)-GFP 41,9 min (\pm 5,3 min) nach Beginn der Kerntrennung der Fall (Abb. 4.17 I). Im Durchschnitt erreichte das Signal von Cdc20(1-80)-GFP in Tochterzellen 70 min nach Beginn der Kerntrennung ein Minimum (Abb. 4.17 B und G). Die Entfernung der potentiellen Cdk-Phosphorylierungsstelle durch die S24A-Mutation beeinflusste den Abbau des Fusionsproteins nur geringfügig. Vor der Anaphase war Cdc20(1-80)-S24A-GFP ebenso stabil wie das Wildtyp-Konstrukt (Abb. 4.17 E) und wurde in Tochterzellen mit einer sehr ähnlichen Kinetik abgebaut (Abb. 4.17 G). Wie im Fall von Cdc20(1-80)-GFP fiel die gemessene Signalintensität der S24A-Mutante in der Mehrzahl der Tochterzellen 45-60 min nach Beginn der Anaphase unter die Hälfte des Maximalwerts. Lediglich der Abbaubeginn war im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt um wenige Minuten verzögert (Abb. 4.17 E-H).

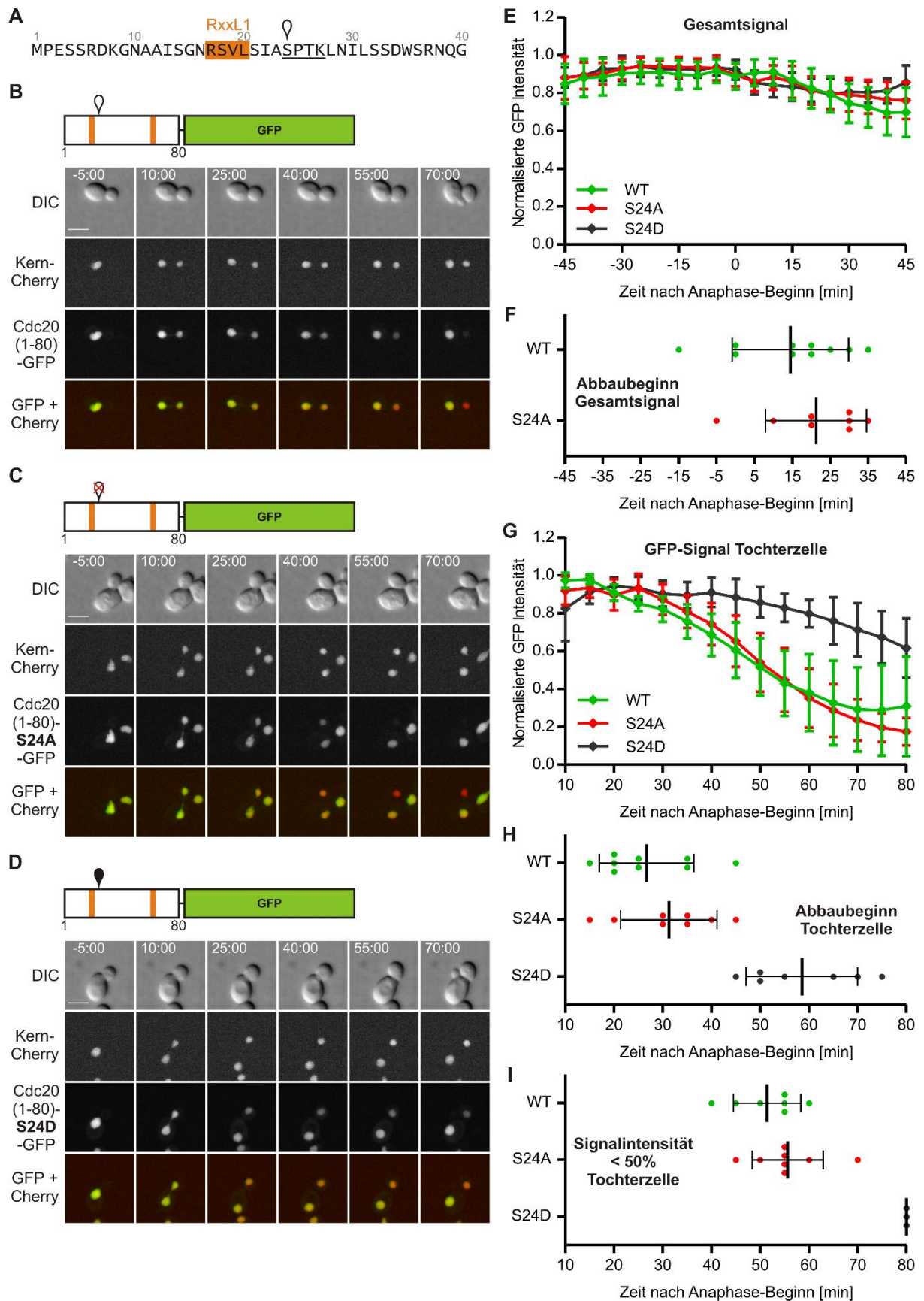


Abbildung 4.17: Rolle der putativen Cdk-Phosphorylierungsstelle Serin-24 für die Instabilität des Cdc20(1-80)-Degrons

(A) Sequenz der N-terminalen 40 Aminosäuren von Cdc20. Das RxxL1-Motiv ist durch einen orangen Kasten gekennzeichnet. Die Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch Cdk ist unterstrichen und die Position

der Phosphat-akzeptierenden Aminosäure durch einen weißen Pin gekennzeichnet. Die Zahlen geben Aminosäurepositionen an. **(B – D)** Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die *CDC20(1-80)-GFP* (B), *cdc20(1-80)-S24A-GFP* (C) oder *cdc20(1-80)-S24D-GFP* (D) von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Es wurden über einen Zeitraum von 2h in 5-minütigen Abständen Zeitrafferaufnahmen erstellt. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Die beginnende Elongation des Zellkerns wurde als Beginn der Anaphase festgelegt und als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min) verwendet. Es sind ausgewählte Zeitwerte für jeweils eine repräsentative Zelle gezeigt. Über den Mikroskopiebildern sind die Konstrukte schematisch dargestellt. Die RxxL-Motive sind durch orangene Kästen gekennzeichnet. Die Position der putativen Cdk-Phosphorylierungsstelle ist mit einem weißen Pin markiert. Die Mutation des Phosphat-akzeptierenden Serinrests zu einem Alaninrest (SPTK zu APTK) ist durch ein rotes Kreuz symbolisiert, während ein schwarzer Pin den Austausch zu einem Aspartatrest (SPTK zu DPTK) anzeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **(E – I)** Vergleich der Degradation von *Cdc20(1-80)-GFP* (WT, grün), *Cdc20(1-80)-S24A-GFP* (S24A, rot) und *Cdc20(1-80)-S24D*, (S24D, grau). Wachsende Zellen, welche die angegebenen Konstrukte von dem *TEF2*-Promotor exprimierten, wurden wie in B – D aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals wurde für einzelne Zellen quantifiziert und auf den Maximalwert normiert. Anschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Zellen eines Stamms gegen die Zeit in einem Liniendiagramm aufgetragen (E und G). Der Zeitwert, ab dem die Signalintensität erstmals um 5% abnahm und im weiteren Verlauf nicht wieder anstieg, wurde als Abbaubeginn definiert und in Form eines Streudiagramms dargestellt (F und H). Der Zeitwert, an dem die Signalintensität erstmals weniger als die Hälfte des Maximalwerts betrug, wurde ebenfalls bestimmt und in einem Streudiagramm dargestellt (I). In E und F sind die Auswertungen für das Gesamtsignal von Mutter- und Tochterzelle gezeigt, während in G – I die Auswertung des GFP-Signals in Tochterzellen wiedergegeben ist. In den Streudiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine einzelne Zelle und die Mittel- und Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert und der Standardabweichung. Die Stichprobengrößen betragen $n = 10$ Zellen in E und F und $n = 9$ (WT) bzw. $n = 8$ (S24A und S24D) Zellen in G – I. In den Streudiagrammen sind nur diejenigen Zellen der Stichproben gezeigt, welche die oben definierten Kriterien erfüllten.

Im Gegensatz zur S24A-Mutation bewirkte die Phospho-mimetische Mutation S24D eine deutliche Stabilisierung von *Cdc20(1-80)-GFP*. In Tochterzellen setzte der Abbau im Schnitt 30 min später ein und erfolgte deutlich langsamer als der Abbau von *Cdc20(1-80)-GFP* (Abb. 4.17 G und H). Dadurch zeigte *Cdc20(1-80)-S24D-GFP* auch 70 min nach Beginn der Anaphase noch ein erkennbares Signal in Tochterzellen (Abb. 4.17 D). Zudem sank die für das S24D-Konstrukt gemessene Signalintensität nur in 3 der 8 untersuchten Zellen und erst 80 min nach Beginn der Kerntrennung unter die Hälfte des Maximalwerts (Abb. 4.17 I). Die verzögerte Degradation hatte zur Folge, dass auf Grundlage der festgelegten Kriterien (Kapitel 6.4.2) kein Abbaubeginn für *Cdc20(1-80)-S24D-GFP* im Gesamtsignal dokumentiert werden konnte. Die Fluoreszenzintensität des Gesamtsignals nahm zwar zu Beginn der Kerntrennung etwas ab, blieb aber im folgenden Verlauf weitestgehend stabil und stieg 30 min nach dem Beginn der Anaphase tendenziell wieder an (Abb. 4.17 E). Da die S24D-Mutation, ebenso wenig wie die S24A-Mutation, die Lokalisation des Fusionsproteins beeinflusste (Abb. 4.17 B – D), kann ausgeschlossen werden, dass die Stabilisierung von *Cdc20(1-80)-S24D-GFP* durch veränderte Lokalisation hervorgerufen wurde. Viel mehr

deuten diese Daten daraufhin, dass der durch APC/C-Cdh1 vermittelte Abbau von Cdc20 durch Phosphorylierung im Bereich der D-Box negativ reguliert sein könnte.

Zusammengefasst zeigt die Kartierung des Cdc20-Degrans, dass eine einzelne D-Box die Instabilität von Cdc20 in der G1-Phase vermittelt und dass der APC/C-Cdh1-abhängige Abbau des Cdc20-Degrans auf den Zellkern beschränkt ist. Durch gezielte Lokalisation des Cdc20-Degrans in verschiedenen Subkompartimenten des Zellkerns konnte festgestellt werden, dass die Aktivität von APC/C-Cdh1 innerhalb des Zellkerns variiert und im Nukleoplasma maximal ist. Die Mutation einer Cdk-Phosphorylierungsstelle im Bereich der D-Box gibt zudem Hinweise darauf, dass der Abbaubeginn von Cdc20 durch Phosphorylierung reguliert sein könnte.

4.3 Beitrag der N-terminalen Domäne von Cdc20 zur APC/C-Aktivierung

Neben dem Degron für APC/C-Cdh1 vermittelte Proteolyse enthält die NTD von Cdc20 weitere Funktionselemente wie das Mad2-Interaktionsmotiv (MIM) und die C-Box. Während das MIM zur Interaktion mit Mad2 und dadurch zur Regulation von Cdc20 durch das Spindelkontrollsystem (SAC, *spindle assembly checkpoint*) dient (Lara-Gonzalez *et al.*, 2012), trägt die C-Box zur Bindung von Cdc20 an den APC/C bei (Schwab *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Somit besitzt die NTD neben regulatorischen Elementen auch Sequenzmotive, die von Bedeutung für die Funktion von Cdc20 als APC/C-Aktivator sind. Aufbauend auf Beobachtungen, die während der Untersuchung zur Regulation von Cdc20 gemacht wurden, wurde in dieser Arbeit auch die Rolle der NTD für die Aktivierung des APC/C beleuchtet.

4.3.1 Die Überexpression der NTD von Cdc20 hemmt das Zellwachstum

In begleitenden Arbeiten zur Regulation von Cdc20 durch die NTD wurde festgestellt, dass die Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* synthetisch letal mit der Deletion von *CDH1* ist (Hacker, 2012) und zudem das Wachstum von Wildtyp-Zellen in einer Dosis-abhängigen Weise hemmt (Bauer, 2013). Die in diesen Arbeiten begonnenen Untersuchungen zur molekularen Grundlage des Wachstum-hemmenden Effekts der NTD von Cdc20 sollte in vorliegender Arbeit fortgeführt und präzisiert werden.

Interessanterweise wirkte sich ein C-terminal verkürztes NTD-Konstrukt, Cdc20(1-180)-GFP, nach Überexpression weniger toxisch auf das Zellwachstum aus als Cdc20(1-248)-GFP (Bauer, 2013). Um die Regionen der NTD, die für die Auslösung des Wachstumsdefekts verantwortlich sind, weiter einzugrenzen, wurden weitere Verkürzungen der NTD hergestellt (Abb. 4.18 A). Die Fusionskonstrukte wurden unter die Kontrolle des durch Galaktose induzierbaren *GAL1*-Promotors gestellt und die Auswirkung ihrer Überexpression auf die Proliferation von Wildtyp-Zellen getestet. Hierzu wurden die Konstrukte in einen Wildtyp-Stamm (K699) eingebracht und das Wachstum der entstandenen Stämme anschließend auf Galaktose-haltigem Medium (XYG) überprüft (Abb. 4.18 B). Da das Ausmaß des Wachstum-hemmenden Effekts von der Proteindosis abhängig war (Bauer, 2013), wurde die Expression der Fusionskonstrukte in den untersuchten Stämmen mittels Westernblot-Analyse gegen das N-terminale Myc3-Epitop kontrolliert (Abb. 4.18 C).

Während die Zellen, die das *CDC20(1-248)-GFP*-Konstrukt enthielten, auf Kontrollplatten mit Glukose-haltigem Medium vergleichbar wie nicht-transformierte Zellen (WT) wuchsen, war ihr Wachstum in Anwesenheit von Galaktose stark gehemmt (Abb. 4.18 B). Eine Verkürzung des NTD-Konstrukts um 68 Aminosäuren ausgehend von dem C-terminalen Ende entfernte das MIM-Motiv und reduzierte den toxischen Effekt nach Überexpression deutlich (Abb. 4.18 B), obwohl das resultierende Cdc20(1-180)-GFP-Konstrukt sogar stärker als Cdc20(1-248)-GFP in den Wildtyp-Zellen exprimiert wurde (Abb. 4.18 C). Dies bestätigte die Ergebnisse einer ersten Charakterisierung des Wachstum-hemmenden Effekts (Bauer, 2013). Im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen (WT) war das Wachstum durch die Überexpression von *CDC20(1-180)-GFP* jedoch weiterhin beeinträchtigt (Abb. 4.18 B). Die zusätzliche Entfernung der C-Box durch Erweiterung der C-terminalen Deletion verringerte den negativen Effekt auf das Zellwachstum zunächst nicht. Das betreffende Konstrukt Cdc20(1-119)-GFP störte die Proliferation der Zellen in gleichem Maß wie das Cdc20(1-180)-GFP-Derivat (Abb. 4.18 B). Dagegen war das Degron-Konstrukt Cdc20(1-80)-GFP trotz hoher Expression kaum toxisch für Wildtyp-Zellen (Abb. 4.18 B und C). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Beeinträchtigung des Zellwachstums nach Überexpression der NTD von Cdc20 auf Sequenzen beruht, die sich C-terminal des Degron-Elements, insbesondere innerhalb der Aminosäuren 181-248, befinden.

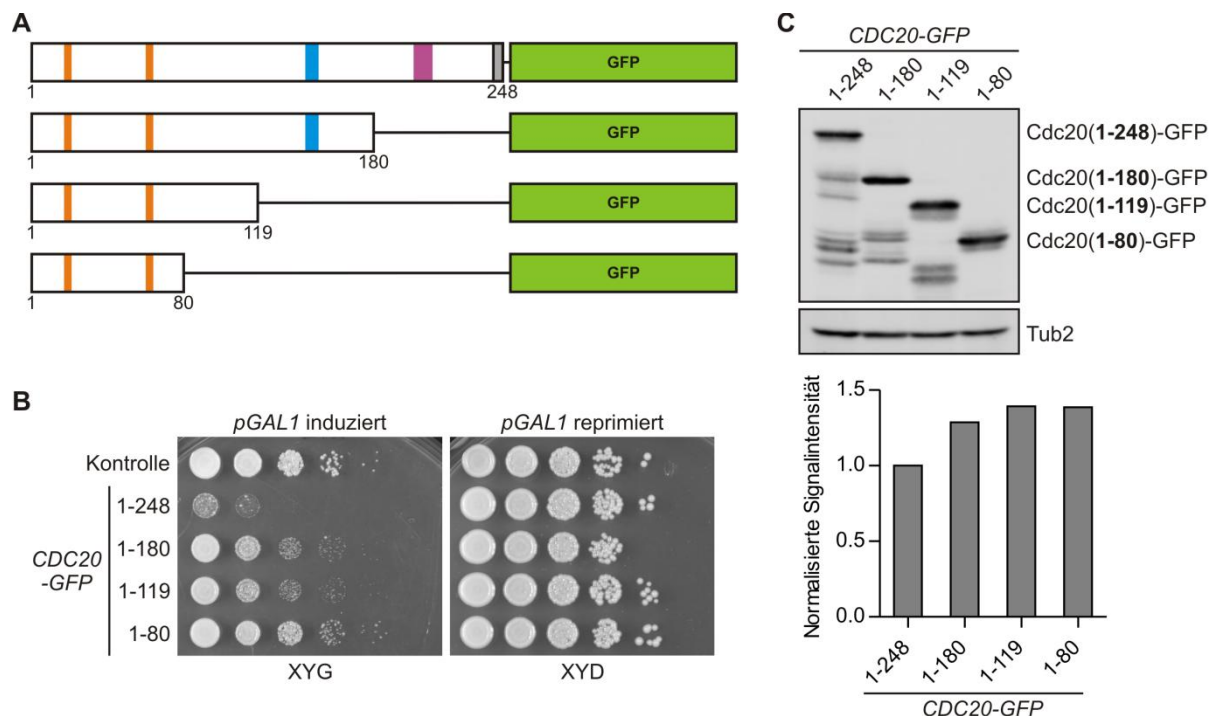


Abbildung 4.18: Zellwachstum nach Überexpression verschiedener NTD-Derivate von Cdc20

(A) Schematische Darstellung der Cdc20-GFP-Fusionskonstrukte. Die RxL-Motive (orange), die C-Box (blau), das Mad2-Interaktionsmotiv (MIM, magenta) und der Beginn der C-terminalen WD40-Domäne (grau) sind durch farbige Kästen hervorgehoben. Die Zahlen geben Aminosäurepositionen an. (B) Zellwachstum nach Überexpression verschiedener Cdc20-GFP-Derivate. Zellen, die *CDC20(1-248)-GFP*, *CDC20(1-180)-GFP*, *CDC20(1-119)-GFP* oder *CDC20(1-80)-GFP* von dem induzierbaren *GAL1*-Promotor exprimierten, wurden in Flüssigmedium ohne Galaktose bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Form einer Verdünnungsreihe mit 1:10-Schritten ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml auf entweder Galaktose-haltigen (XYG, induzierende Bedingungen) oder Glukose-haltigen Vollmediumsplatten (XYD, reprimierende Bedingungen) getropft und 48 h bei 25°C inkubiert. Als Kontrolle diente ein Stamm, der kein Cdc20-GFP-Konstrukt exprimiert. (C) Westernblot-Analyse für den Vergleich der Expression der *CDC20-GFP*-Derivate in asynchron wachsenden Zellen. Die Expression der Fusionskonstrukte von dem *GAL1*-Promotor wurde durch Zugabe von Galaktose für 2 h induziert. Danach wurden Proteinrohextrakte der Zellen hergestellt und die Cdc20-GFP-Fusionsproteine wurden mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers in der Westernblot-Analyse detektiert. Tubulin (Tub2) wurde als Ladekontrolle mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen. Das Säulendiagramm zeigt die Quantifizierung der detektierten Cdc20-GFP-Signale. Die Signalintensitäten der Cdc20-GFP-Konstrukte wurden auf die Intensitäten der jeweiligen Tub2-Signale normiert und der für Cdc20(1-248)-GFP ermittelte Wert wurde gleich 1 gesetzt.

4.3.1.1 Die anhaltende Überexpression der NTD von Cdc20 verringert die Proteinlevel des S-Phase Cyclins Clb5

Die Analyse der verkürzten NTD-Konstrukte deutete an, dass die Region von Cdc20, die das MIM enthält, bedeutend für den wachstumshemmenden Effekt von *CDC20(1-248)-GFP* nach Überexpression ist (Abb. 4.18). Daher war eine erste Vermutung, dass das NTD-Konstrukt möglicherweise über das MIM mit der SAC-Komponente Mad2 interagiert und dadurch die Bildung des MCC (*mitotic checkpoint complex*; De Antoni *et al.*, 2005) induziert. Die

reduzierte Proliferation der Zellen wäre demnach eine Folge der Inhibition des APC/C-Cdc20 durch den MCC, wodurch der Eintritt der Zellen in die Anaphase gestört wird. Diese Hypothese konnte jedoch entkräftet werden, da der wachstumshemmende Effekt von Cdc20(1-248)-GFP auch in Abwesenheit von Mad2 Bestand hatte (Bauer, 2013). Damit übereinstimmend zeigten Messungen des DNA-Gehalts, dass die Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* nicht in einem Arrest der Zellen mit replizierter DNA resultierte, wie es bei MCC-abhängiger Inhibition erwartet worden wäre (Bauer, 2013). Stattdessen deutete das DNA-Profil auf Replikationsstörungen nach anhaltender Überexpression des Konstrukts hin.

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass in humanem Cdc20 das MIM mit einem APC/C-Bindemotiv überlappt (Zhang und Lees, 2001; Izawa und Pines, 2012). Zudem wurde berichtet, dass die NTD von Cdc20 in Extrakten von *Xenopus*-Eizellen hinreichend für eine Aktivierung des APC/C gegen bestimmte Substrate ist (Kimata *et al.*, 2008). Somit wäre es denkbar, dass die NTD von Cdc20 den APC/C auch in *S. cerevisiae* binden und aktivieren kann und dadurch eine gestörte Zellzyklusprogression hervorruft. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die Expression von *CDC20(1-248)-GFP* in wachsenden Zellen durch Zugabe von Galaktose induziert und die Stabilität der APC/C-Substrate Pds1, Clb5 und Clb2 über die Zeit in Westernblot-Analysen untersucht. Zu diesem Zweck exprimierten die Zellen Epitop-markierte Versionen von Pds1 (Pds1-HA6; Ciosk *et al.*, 1998) und Clb5 (Clb5-FLAG3). Darüber hinaus wurde der DNA-Gehalt der Zellen im Laufe des Experiments mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen, die das *CDC20(1-248)-GFP* nicht integriert hatten.

Im Gegensatz zur Situation in den Kontrollzellen, in denen die Proteinlevel der untersuchten APC/C-Substrate weitgehend stabil blieb, führte die Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* mit zunehmender Dauer des Experiments zu einer Reduktion der Clb5-Level (Abb. 4.19 A und B). Laut Quantifizierung der detektierten Signale im Westernblot begann die Proteinmenge von Clb5 bereits 2 h nach Induktion der *CDC20(1-248)-GFP*-Expression zu sinken und betrug nach 8 h ein Drittel des Ausgangswertes (Abb. 4.19 B). Neben den Clb5-Level waren auch die Proteinlevel von Pds1 von der Überexpression der NTD betroffen, allerdings nahmen die Pds1-Level nur leicht ab und lagen nach 8 h Induktionszeit noch bei Dreiviertel des Ausgangswertes (Abb. 4.19 B).

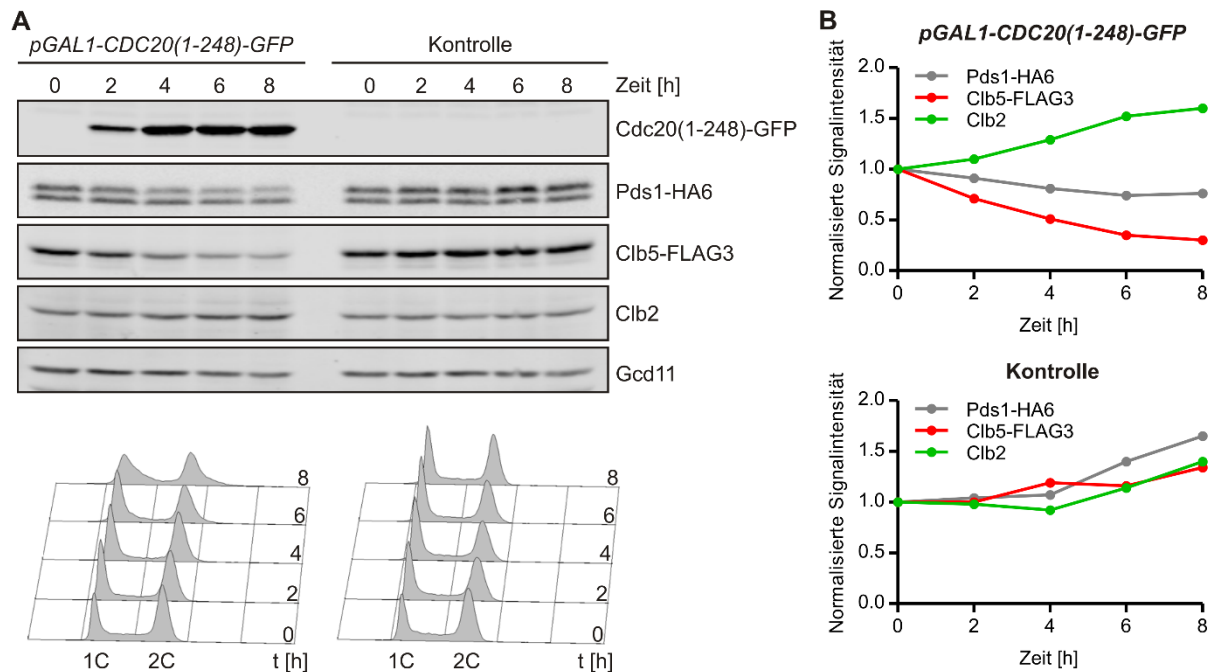


Abbildung 4.19: Stabilität von APC/C-Substraten nach Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP*

(A) Westernblot-Analyse zur Stabilität von Pds1-HA6, Clb5-FLAG3 und Clb2 und DNA-Profil von Zellen nach Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP*. Die Expression von *CDC20(1-248)-GFP* von dem *GAL1*-Promotor wurde in asynchron wachsenden Zellen, die endogen mit einem Epitop-markierte Versionen von *PDS1* (*PDS1-HA6*) und *CLB5* (*CLB5-FLAG3*) co-exprimierten, durch Zugabe von Galaktose induziert. Vor ($t = 0$ h) und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Induktion wurden Zellen entnommen und sowohl Proteinrohextrakte für die Westernblot-Analyse (oben) hergestellt als auch Zellen für die Messung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie (unten) mit Sytox-Green gefärbt (1C: einfacher DNA-Gehalt; 2C: zweifacher DNA-Gehalt). Als Kontrolle dienten Zellen, welche die Epitop-markierten Versionen von *PDS1* und *CLB5*, jedoch nicht das *CDC20(1-248)-GFP*-Konstrukt exprimierten. Der Nachweis von Cdc20(1-248)-GFP in der Westernblot-Analyse erfolgte mit einem Myc-spezifischen Antikörper. Pds1-HA6 und Clb5-FLAG3 wurden mit Hilfe eines HA-spezifischen bzw. eines FLAG-spezifischen Antikörpers detektiert. Clb2 und Gcd11, das als Ladekontrolle diente, wurden mittels spezifischer Antiseren nachgewiesen. (B) Quantifizierung der Signalintensitäten der in der Westernblot-Analyse detektierten Proteine Pds1-HA6, Clb5-FLAG3 und Clb2. Die gemessenen Signalintensitäten wurden auf das jeweilige Gcd11-Signal normiert und der Wert zum Zeitpunkt vor der Induktion ($t = 0$ h) gleich 1 gesetzt.

Die Proteinmenge von Clb2 verringerte sich in Folge der Überexpression des NTD-Konstrukts nicht, sondern stieg mit der Zeit sogar etwas an (Abb. 4.19 A und B). Aus diesen Daten lässt sich folgern, dass die NTD von Cdc20 nach Überexpression vor allem eine Destabilisierung des S-Phase-Cyclins Clb5 bewirkt.

Mit Blick auf das DNA-Profil, das im Fall der Kontrollzellen unverändert blieb, konnte nach 6 h Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* der Beginn einer einseitigen Verbreiterung des 1C-Signals, das Zellen mit einfachem DNA-Gehalt repräsentiert, in Richtung des 2C-Signals beobachtet werden (Abb. 4.19 A). Dieser Effekt war nach 8 h Induktion deutlich verstärkt und weist auf Störungen in der DNA-Replikation hin. Da die Akkumulation des Cyclins Clb5

und der damit einhergehende Anstieg der Clb5-Cdk1-Aktivität ein wichtiger Faktor für die Initiation der DNA-Replikation in der S-Phase ist (Epstein und Cross, 1992; Schwob und Nasmyth, 1993), sind die Replikationsstörungen vermutlich auf die Destabilisierung von Clb5 zurückzuführen.

Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass der Wachstum-hemmende Effekt der Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* auf einer ektopischen Aktivierung des APC/C beruht, welche sich durch Reduktion der Clb5-Level in Störungen der DNA-Replikation in der S-Phase äußert.

4.3.1.2 Die Entfernung von RxxL1 schwächt den Wachstum-hemmenden Effekt der NTD von Cdc20 ab

Die Beobachtung, dass hohe Mengen von Cdc20(1-248)-GFP zu verringerten Clb5-Level führen (Abb. 4.19), kann als Erklärung dienen, warum die Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* synthetisch letal mit der Deletion von *CDH1* ist (Hacker, 2012). Es ist anzunehmen, dass Cdh1 der Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* in der G1-Phase entgegenwirkt, indem es das Fusionsprotein für den Abbau markiert. Dadurch können die Proteinlevel von Clb5, und möglicherweise auch von Clb6, trotz der Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* ausreichend ansteigen, um einen regulären Eintritt in die S-Phase zu ermöglichen. In Abwesenheit von Cdh1 ist Cdc20(1-248)-GFP dagegen bereits in der G1-Phase in ausreichender Menge vorhanden, um die Akkumulation der S-Phase-Cycline zu unterbinden, wodurch der Eintritt in die S-Phase verhindert wird und die Zellen nicht proliferieren können. Dadurch lässt sich zudem die Dosis-Abhängigkeit des toxischen Effekts erklären (Bauer, 2013). Vermutlich wird bei entsprechend hoher Expression von *CDC20(1-248)-GFP* die Kapazität der Cdh1-abhängigen Degradation überschritten und Cdc20(1-248)-GFP kann in der G1-Phase akkumulieren und den G1/S-Übergang stören. Tatsächlich tolerierten die Zellen die Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* bei hoher Temperatur (37°C), bei welcher die Expression durch den *GAL1*-Promotor beeinträchtigt ist, besser als bei einer Temperatur von 25°C (Abb. 4.20 A). Dennoch war die verringerte Expression bei hoher Temperatur noch hinreichend, um Wachstum in Abwesenheit von Cdh1 zu verhindern (*cdh1Δ CDC20(1-248)-GFP* in Abb. 4.20 A).

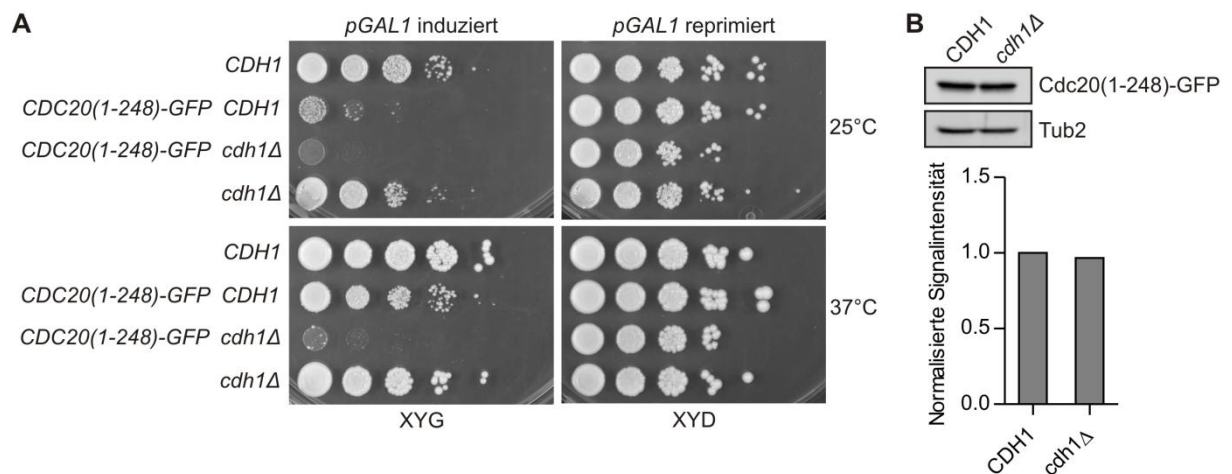


Abbildung 4.20: Zellwachstum nach Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* in *cdh1Δ*-Zellen

(A) Wachstum von *CDH1*- und *cdh1Δ*-Zellen, die *CDC20(1-248)-GFP* von dem induzierbaren *GAL1*-Promotor exprimierten. Die Zellen wurden in Flüssigmedium ohne Galaktose bis zur stationären Phase kultiviert und anschließend wie in Abb. 4.18 B beschrieben auf entweder Galaktose-haltigen (XYG, induzierende Bedingungen) oder Glukose-haltigen Vollmediumsplatten (XYD, reprimierende Bedingungen) getropft und 48 h bei entweder 25°C oder 37°C inkubiert. Als Kontrollen dienten *CDH1*- und *cdh1Δ*-Zellen, die das *CDC20(1-248)-GFP*-Konstrukt nicht enthielten. **(B)** Westernblot-Analyse zum Vergleich der Expression von *CDC20(1-248)-GFP* in asynchron wachsenden *CDH1*- und *cdh1Δ*-Zellen. Die Expression von *CDC20(1-248)-GFP* von dem *GAL1*-Promotor wurde durch Zugabe von Galaktose für 2 h induziert. In der Westernblot-Analyse wurden Cdc20(1-248)-GFP mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers und Tubulin (Tub2) als Ladekontrolle mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen. Das Säulendiagramm zeigt die Quantifizierung der detektierten Cdc20(1-248)-GFP-Signale, die auf die Intensitäten der jeweiligen Tub2-Signale normiert wurden. Der ermittelte Wert für Cdc20(1-248)-GFP aus *CDH1*-Zellen wurde gleich 1 gesetzt.

In asynchron wachsenden Kulturen war die Proteinmenge von Cdc20(1-248)-GFP in *cdh1Δ*-Zellen gegenüber *CDH1*-Zellen nicht erhöht (Abb. 4.20 B). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass *cdh1Δ*-Zellen durch die Abwesenheit von APC/C-Cdh1-Aktivität eine verkürzte G1-Phase aufweisen. Daher ist die Stabilisierung von Cdc20(1-248)-GFP während der G1-Phase in den Zelllysaten von asynchron wachsenden Kulturen, in denen sich viele Zellen außerhalb der G1-Phase befinden, möglicherweise nicht sichtbar.

In der Annahme, dass hohe Mengen von Cdc20(1-248)-GFP am G1/S-Übergang die Akkumulation von Clb5 erschweren, sollte eine Stabilisierung des Fusionsproteins in der G1-Phase den negativen Effekt auf das Zellwachstum weiter verstärken. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das RxxL1-Motiv, das die Cdh1-abhängige Degradation von Cdc20 in der G1-Phase vermittelt (Abb. 4.14), in Cdc20(1-248)-GFP durch Mutation entfernt (Abb. 4.21 A). Anschließend wurde der Einfluss des entstandenen *cdc20(1-248)rxl1-GFP* auf das Zellwachstum nach Überexpression untersucht. Die Expression der Fusionskonstrukte erfolgte von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor. Um eine mögliche Verschlechterung des

Wachstums besser detektieren zu können, wurde ein Stamm mit moderater Expression des Wildtyp-Konstrukts als Referenz ausgewählt (Abb. 4.21 B). Dadurch wies der betreffende Stamm nur einen geringen Wachstumsdefekt auf, der vor allem nach 24 h Inkubation gegenüber den Kontrollzellen sichtbar wurde (Abb. 4.21 C).

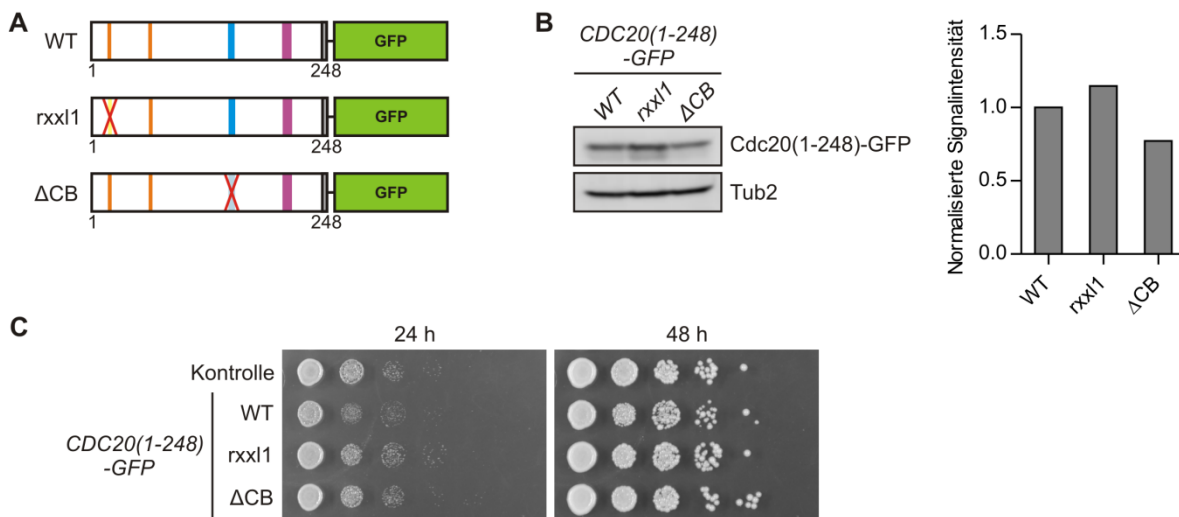


Abbildung 4.21: Zellwachstum nach Überexpression von mutierten *CDC20(1-248)-GFP*-Derivaten

(A) Schematische Darstellung der *Cdc20(1-248)-GFP*-Derivate. Die RxxL-Motive (orange), die C-Box (blau), das Mad2-Interaktionsmotiv (MIM, magenta) und der Beginn der WD40-Domäne (grau) sind durch farbige Kästen hervorgehoben. Die Mutation des RxxL1-Motivs (*rxx1*; RxxL zu AxxA) und die Deletion der C-Box (Δ CB; Deletion der Aminosäuren 55-59; Schwab *et al.*, 2001) sind durch rote Kreuze symbolisiert. Die Zahlen beziehen sich auf Aminosäurepositionen. **(B)** Westernblot-Analyse für den Vergleich der Expression von *CDC20(1-248)-GFP* (WT), *cdc20(1-248)rxx1-GFP* (*rxx1*) und *cdc20(1-248) Δ CB-GFP* (Δ CB) in asynchron wachsenden Zellen. Die Expression der Derivate erfolgte von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor. Der Nachweis der Proteine und die Quantifizierung der detektierten Signale wurden wie in Abb. 4.18 C durchgeführt. Der für *Cdc20(1-248)-GFP* (WT) ermittelte Wert wurde gleich 1 gesetzt. **(C)** Zellwachstum nach Überexpression der *CDC20(1-248)-GFP*-Derivate von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor. Die Zellen wurden in Flüssigmedium bis zur stationären Phase kultiviert und anschließend wie in Abb. 4.18 B beschrieben auf eine Vollmediumsplatte mit Glukose getropft und bei 25°C inkubiert. Das Wachstum wurde nach 24 h und 48 h dokumentiert. Als Kontrolle diente ein Stamm, der kein *CDC20(1-248)-GFP*-Konstrukt exprimiert.

Interessanterweise verstärkte die Entfernung des RxxL1-Motivs den toxischen Effekt von *Cdc20(1-248)-GFP* auf das Zellwachstum nicht. Im Gegenteil zeigten die Zellen, die *cdc20(1-248)rxx1-GFP* exprimierten, ein besseres Wachstum als Zellen, die das Wildtyp-Konstrukt enthielten (Abb. 4.21 C). Da das *rxx1*-Konstrukt zudem stärker als *CDC20(1-248)-GFP* exprimiert wurde (Abb. 4.21 B), spricht dieses Ergebnis dafür, dass das RxxL1-Motiv zur Entstehung des wachstumshemmenden Effekts von *Cdc20(1-248)-GFP* beiträgt. Ebenso wie die Mutation des RxxL1-Motivs schwächte die Deletion der C-Box den negativen Effekt von

Cdc20(1-248)-GFP auf das Zellwachstum ab (Abb. 4.21 C). Da es sich bei der C-Box um ein APC/C-Bindemotiv handelt, steht dies im Einklang mit der Beobachtung, dass der durch die Überexpression von *CDC20(1-248)-GFP* verursachte Wachstumsdefekt auf der ektopischen Aktivierung des APC/C durch das NTD-Konstrukt basiert (Kapitel 4.3.1.1). In diesem Zusammenhang lassen diese Daten den Schluss zu, dass das RxxL1-Motiv einen Beitrag zur Aktivierung des APC/C leisten könnte.

4.3.2 Die Rolle der RxxL-Motive in Cdc20 für die Aktivator-Funktion

Das RxxL1-Motiv in Cdc20 wurde sowohl in dieser als auch in früheren Arbeiten als Regulationselement identifiziert, das als Erkennungssignal für Cdh1-vermittelte Degradation die Aktivität von Cdc20 negativ reguliert (Kapitel 4.2; Prinz *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998; Robbins und Cross, 2010a). Allerdings gaben die Untersuchungen zur Grundlage des Wachstum-hemmenden Effekts, der nach Überexpression der NTD von Cdc20 beobachtet wurde (Abb. 4.18), Hinweise darauf, dass das RxxL1-Motiv auch positiv zur Funktion von Cdc20 beitragen könnte (Abb. 4.19 und 4.21). Dieser Möglichkeit wurde im Folgenden weiter nachgegangen.

4.3.2.1 Die Mutation der RxxL-Motive in Cdc20 zeigt einen synthetischen Effekt mit der Deletion des IR-Motivs

Um zu überprüfen, ob die RxxL-Motive für die Aktivität von Cdc20 notwendig sind, wurden die Sequenzelemente durch Alanin-Mutagenese entfernt (RxxL zu AxxA) und die entstandenen Konstrukte anschließend auf ihre Fähigkeit getestet, die Deletion von *CDC20* zu komplementieren. Hierzu wurden die *CDC20*-Konstrukte über das integrative Vektor-Plasmid Yiplac211 (Gietz und Sugino, 1988) stabil am Genort des *URA3*-Markergens in das Genom eines heterozygot diploiden Stamms integriert, in welchem eine Kopie der beiden *CDC20*-Gene durch Insertion des *HIS3*-Markergens unterbrochen war (Wegerer, 2004). Die Fähigkeit der *CDC20*-Derivate zur Komplementation von *cdc20Δ* wurde nach Sporulation der diploiden Zellen und Vereinzelung der haploiden Nachkommen in Tetradenanalysen getestet. Die *CDC20*-Konstrukte standen unter Kontrolle des endogenen *CDC20*-Promotors und waren zudem mit einem N-terminalen Myc3-Epitop zur Analyse der Proteinmengen im Westernblot versehen. Im Fall einer Komplementation wurden das Wachstum und das DNA-

Profil der geretteten *cdc20Δ*-Sporen untersucht, um die Vollständigkeit der Komplementation präziser erfassen zu können.

Als Referenz diente in den Komplementationsstudien ein heterozygot-diploider Stamm aus einer früheren Arbeit (Höckner, 2011), in welchem die Wildtyp-Version des *CDC20*-Gens am *URA3*-Genort integriert ist. Trotz sehr niedriger Expression, die keine Detektion von Myc3-Cdc20 im Westernblot ermöglichte (Höckner, 2011), komplementierte das Wildtyp-Konstrukt die Deletion von *CDC20* ohne Wachstumsdefekt (mit ΔC gekennzeichnete Sporen in Abb. 4.22 A). Die durch *MYC3-CDC20* geretteten *cdc20Δ*-Sporen unterschieden sich in ihrem Wachstum bei hohen Temperaturen und ihrem DNA-Profil in asynchron-wachsender Kultur nicht von Wildtyp-Zellen (Abb. 4.23 A und B), sodass die Komplementation durch das Wildtyp-Konstrukt als vollständig angesehen werden kann. Die Funktion von Cdc20 wurde weder durch getrennte noch durch simultane Mutation der RxxL-Motive beeinträchtigt, da die resultierenden rxxl-Konstrukte die Deletion von *cdc20Δ* ebenfalls ohne Wachstumsdefekt komplementierten (Abb. 4.22 B und C und Abb. 8.12 A im Anhang). Das Wachstum sowie das DNA-Profil der geretteten *cdc20Δ*-Nachkommen belegten die Vollständigkeit der Komplementation (Abb. 4.23). Daher scheinen die RxxL-Motive für die Aktivität von Cdc20 verzichtbar zu sein. Da die rxxl-Konstrukte im Westernblot nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.22 L), liegt ihr Expressionsniveau über dem des nicht detektierbaren Wildtyp-Konstrukts (Höckner, 2011). Somit besteht die Möglichkeit, dass die rxxl-Mutationen die Aktivität von Cdc20 zwar beeinträchtigen, dieser Effekt jedoch durch die höhere Expression kompensiert und überdeckt wird.

Um mögliche, subtile Effekte der RxxL-Mutationen auf die Funktion von Cdc20 erfassen zu können, sollten die RxxL-Motive als Nächstes in einem Cdc20-Derivat mutiert werden, das bereits eine reduzierte Aktivität aufweist. Hierzu wurde ein Cdc20-Konstrukt ausgewählt, welchem das IR-Motiv durch C-terminale Verkürzung entfernt wurde (*cdc20ΔIR*). Die Deletion des IR-Motivs, das ein konserviertes Bindemotiv für die Interaktion mit dem APC/C ist (Vodermaier *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2016), verhinderte eine vollständige Komplementation von *cdc20Δ*, da die durch *cdc20ΔIR* geretteten Sporen in den Tetradenanalysen ein geringeres Wachstum als Wildtyp-Sporen aufwiesen (Abb. 4.22 D). Dieser Wachstumsdefekt prägte sich zudem bei hohen Temperaturen aus (Abb. 4.23 A) und führte zu einem veränderten DNA-Profil der Zellen in asynchroner Kultur (Abb. 4.23 B).

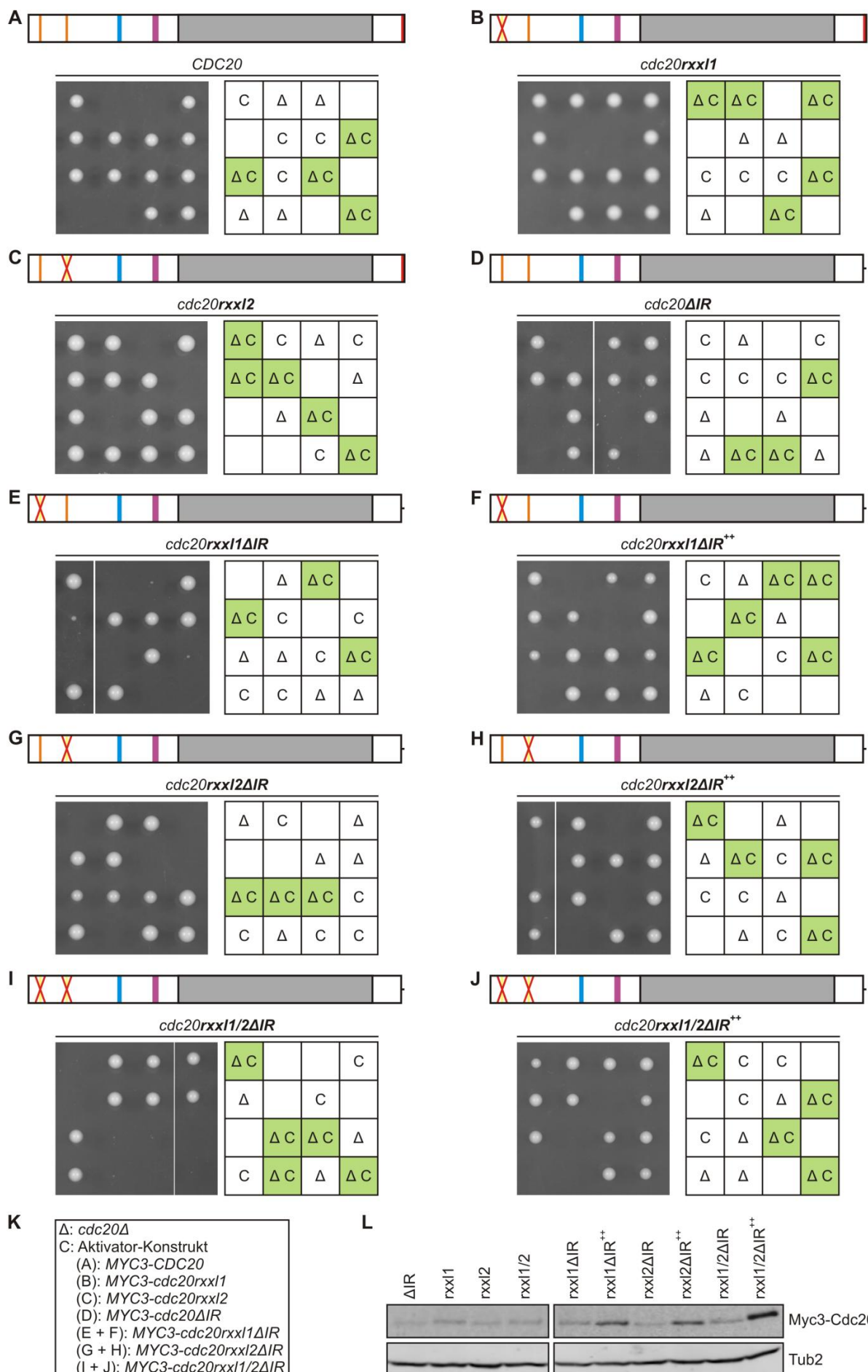


Abbildung 4.22: Komplementation von *cdc20Δ* durch *cdc20rxxl*-Derivate

(A – J) Tetradenanalysen zur Komplementationsfähigkeit von *CDC20*-Derivaten. Heterozygot-diploide *CDC20/cdc20Δ*-Zellen, welche entweder *CDC20* (A), *cdc20rxxl1* (B), *cdc20rxxl2* (C), *cdc20ΔIR* (D), *cdc20rxxl1ΔIR* (E und F), *cdc20rxxl2ΔIR* (G und H) oder *cdc20rxxl1/2ΔIR* (I und J) von dem endogenen *CDC20*-Promotor exprimierten, wurden zur Sporulation gebracht und die vier haploiden Nachkommen der entstandenen Tetraden wurden auf einer Vollmediumsplatte vereinzelt. Das Wachstum der Sporen bei 30°C wurde nach 48 h dokumentiert und anschließend die Genotypen bestimmt. Es sind die Sporen von jeweils vier repräsentativen Tetraden in vertikaler Orientierung gezeigt. Die Tabelle gibt die Auswertung der relevanten Genotypen wieder, wobei grün hinterlegte Felder eine erfolgreiche Komplementation markieren. Der Namenszusatz ++ kennzeichnet eine erhöhte Expression des Konstrukts. Zur Veranschaulichung befindet sich über den Tetraden eine schematische Darstellung des jeweiligen Konstrukts. Die RxxL-Motive (orange), die C-Box (blau), das MIM (magenta), die WD40-Domäne (grau) und das IR-Motiv (rot) sind durch farbige Kästen hervorgehoben. Die Mutation der RxxL-Motive (RxxL zu AxxA) ist durch rote Kreuze und die Deletion des IR-Motivs ist durch einen schwarzen Strich gekennzeichnet. (K) Legende zur Auswertung der Genotypen in A – J. (L) Westernblot-Analyse für den Vergleich der Expression der *CDC20*-Derivate in den heterozygot-diploiden *CDC20/cdc20Δ*-Zellen. Es wurden Proteinrohextrakte von asynchron wachsenden Kulturen hergestellt und die Cdc20-Derivate wurden über ein N-terminales Myc3-Epitop mit Hilfe eines Myc-spezifischen Antikörpers detektiert. Tubulin (Tub2) wurde als Ladekontrolle mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen. Die Expression von Wildtyp-Konstrukts (*CDC20*) war in einer früheren Arbeit (Höckner, 2011) nicht nachweisbar und wurde daher nicht getestet. Die Komplementation durch das *rxxl1/2*-Konstrukt ist in Abbildung 8.12 A im Anhang gezeigt.

Gegenüber Wildtyp-Zellen konnte im Fall von *cdc20ΔIR*-Nachkommen eine Zunahme des 2C-Signals bei gleichzeitiger Abnahme des 1C-Signals beobachtet werden. Somit enthielt die Kultur der durch *cdc20ΔIR* geretteten *cdc20Δ*-Zellen einen höheren Anteil an Zellen mit replizierter DNA. Da Cdc20 in der Mitose aktiv ist, deutet dies auf einen verlangsamten Ablauf der Mitose in den *cdc20ΔIR*-Mutanten hin.

Interessanterweise verstärkte die zusätzliche Entfernung der RxxL-Motive den negativen Effekt der Δ IR-Mutation auf die Zellzyklusprogression. Dies äußerte sich in einem reduzierten Wachstum sowohl in der Tetradenanalyse (Abb. 4.22 E, G und I) als auch in Wachstumstests bei hoher Temperatur (Abb. 4.23 A) und in einer Abnahme des 1C-Signals im DNA-Profil der geretteten Zellen (Abb. 4.23 B). Dabei wirkte sich die zusätzliche Mutation des RxxL1-Motivs stärker aus als die zusätzliche Mutation des RxxL2-Motivs (Abb. 4.22, E und G, und 4.23) und die Mutation beider RxxL-Motive in *cdc20ΔIR* zeigte einen additiven Effekt (Abb. 4.22 I und 4.23). Zudem konnte das Wachstum der Zellen durch eine höhere Expression der Konstrukte verbessert werden (in Abb. 4.22 und 4.23 mit dem Namenszusatz ++ gekennzeichnet).

Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die RxxL-Motive neben der Regulation auch eine unterstützende Funktion für die Aktivität von Cdc20 haben. Allerdings scheinen die RxxL-Motive gegenüber anderen Sequenzelementen eine untergeordnete Rolle für die Aktivität von Cdc20 zu spielen, da sich ihre Mutation nur in Verbindung mit einer weiteren, Aktivitäts-reduzierenden Mutation auswirkte.

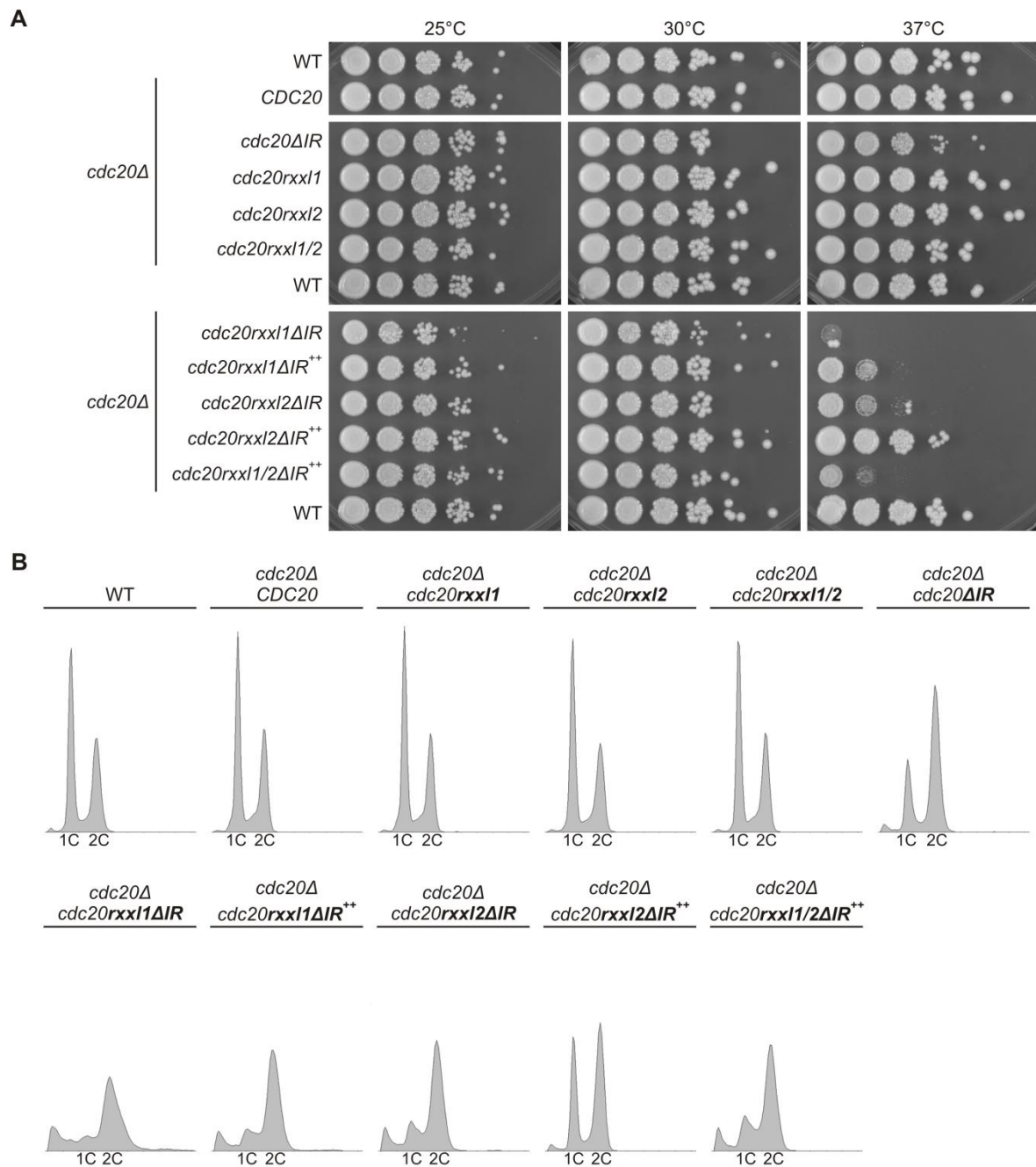


Abbildung 4.23: Zellwachstum und DNA-Profil nach Komplementation von *cdc20Δ* durch *cdc20rxxl*-Derivate

(A) Wachstum von *cdc20Δ*-Zellen, welche durch die angegebenen *CDC20*-Derivate gerettet wurden (Abb. 4.22 und Abb. 8.12 im Anhang). Die Zellen wurden in Flüssigmedium bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Form einer Verdünnungsreihe mit 1:10-Schritten ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml auf Vollmediumsplatten getropft und 48 h bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Als Kontrolle diente der Wildtyp-Stamm K699 (WT). **(B)** DNA-Profil von *cdc20Δ*-Zellen, welche durch die angegebenen *CDC20*-Derivate gerettet wurden (Abb. 4.22 und Abb. 8.12 im Anhang). Asynchron in Raffinose-haltigem Flüssigmedium wachsende Zellen wurden mit Ethanol fixiert und für die Messung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie mit Sytox Green gefärbt. Das 1C-Signal repräsentiert den einfachen und das 2C-Signal den zweifachen DNA-Gehalt. Als Kontrolle diente der Wildtyp-Stamm K699 (WT).

4.3.2.2 Die RxxL-Motive von Cdc20 spielen für die Aktivierung des APC/C eine untergeordnete Rolle

Um die Bedeutung der RxxL-Motive für die Aktivität von Cdc20 weiter zu charakterisieren, sollten die rxxl-Mutanten auf ihre Fähigkeit untersucht werden, nach Überexpression den Abbau von Cdc20-Substraten zu induzieren (Visintin *et al.*, 1997). Hierzu wurden die *CDC20*-Konstrukte unter Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors gestellt und in asynchron wachsenden Zellen überexprimiert. Anschließend wurde die Auswirkung der Überexpression auf die Stabilität der APC/C-Substrate Pds1, Clb5 und Clb2 in Westernblot-Analysen verfolgt, um Rückschlüsse auf die Aktivität der Cdc20-Derivate ziehen zu können. Für die Detektion im Westernblot wurden Pds1 und Clb5 mit endogenen Epitop-Markierungen versehen (Pds1-HA6 und Clb5-FLAG3).

Im Einklang mit früheren Daten (Visintin *et al.*, 1997) führte die Überexpression von *CDC20* zu einer Destabilisierung von Pds1, hatte aber keinen Einfluss auf die Proteinlevel des M-Phase-Cyclins Clb2 (Abb. 4.24 A, D und F). Neben Pds1 reduzierte die ektopische Expression von *CDC20* auch die Proteinmenge des S-Phase-Cyclins Clb5. Die Quantifizierung der detektierten Signale zeigte, dass sich die Proteinmengen von Clb5-FLAG3 und Pds1-HA6 bereits nach 20 min Überexpression verringerten (Abb. 4.24 D und E). Während die Level von Pds1-HA6 nach 90 min ein Minimum erreichten (Abb. 4.24 D), nahmen die Level von Clb5-FLAG3 mit höheren Raten ab und waren bereits nach 60 min minimal (Abb. 4.24 E). In beiden Fällen sanken die Proteinmengen von Clb5 und Pds1 im weiteren Verlauf nicht weiter, was auf die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Cdc20-induzierter Proteolyse und Neusynthese der Proteine ab den jeweiligen Zeitpunkten hindeutet.

Die Fähigkeit von Cdc20, nach Überexpression den Abbau der Substrate Pds1 und Clb5 zu induzieren, wurde weder durch die separate Mutation (rxxl1 und rxxl2) noch durch die simultane Mutation der RxxL-Motive (rxxl1/2) beeinträchtigt (Abb. 4.24 A und B). Die Proteinlevel von Pds1-HA6 und Clb5-FLAG3 nahmen nach der Überexpression der rxxl-Konstrukte mit identischer Kinetik wie nach der Überexpression des Wildtyp-Konstrukts ab (Abb. 4.24 D und E). Lediglich die Level von Pds1-HA6 stiegen im Fall der Überexpression von *cdc20rxxl2* nach 20 min zunächst etwas an, verringerten sich anschließend aber mit ähnlichen Raten wie nach der Überexpression von *CDC20*. Ebenso wie Wildtyp-Cdc20 waren auch die rxxl-Derivate nicht fähig, Clb2 zu destabilisieren (Abb. 4.24 A, B und F).

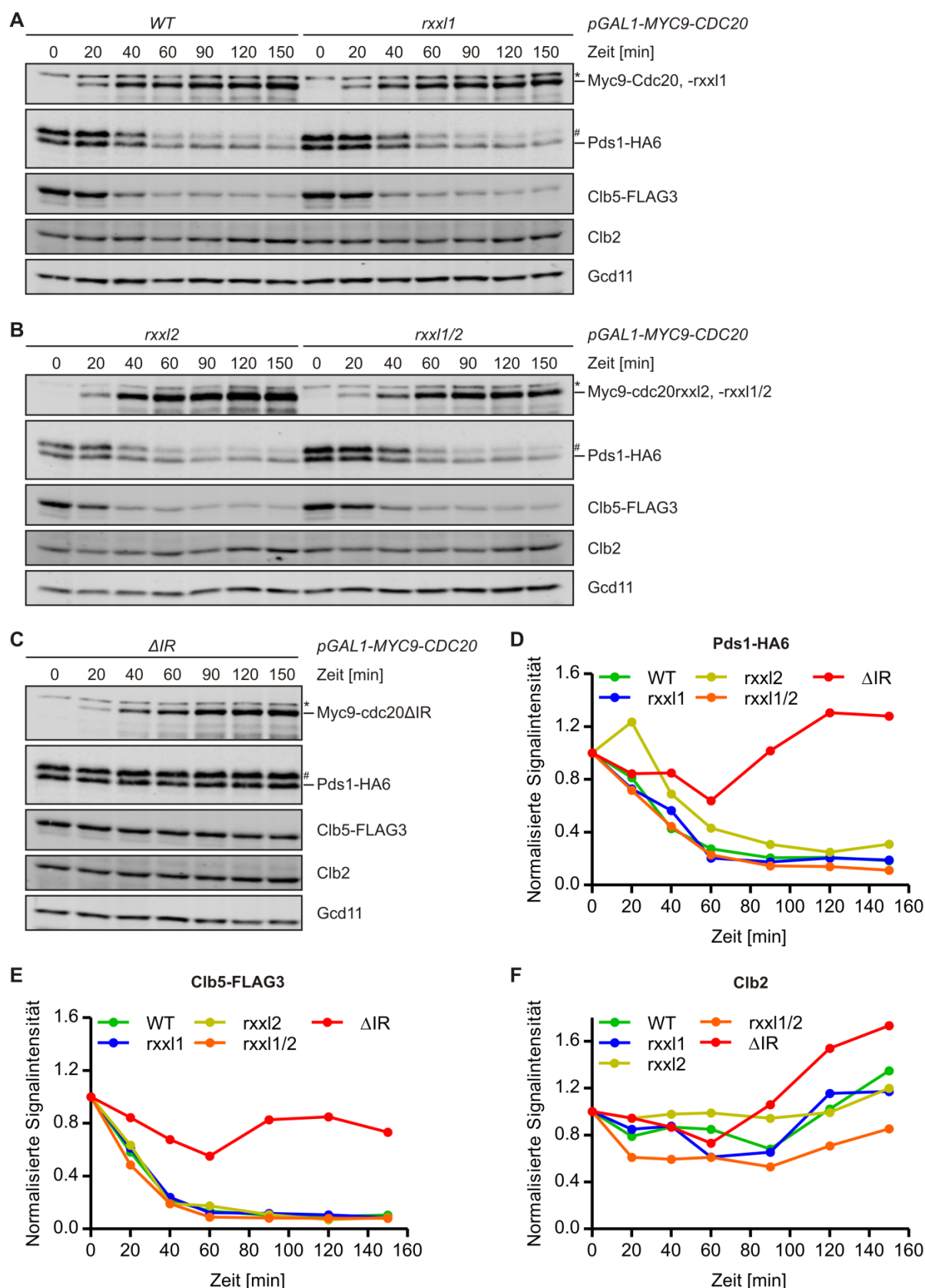


Abbildung 4.24: Stabilität von APC/C-Substraten nach Überexpression von *cdc20rxxl* und *cdc20ΔIR*-Derivaten
(A – C) Westernblot-Analyse zur Stabilität von Pds1-HA6, Clb5-FLAG3 und Clb2 nach Überexpression von *CDC20* (WT in A), *cdc20rxxl1* (*rxxl1* in A), *cdc20rxxl2* (*rxxl2* in B), *cdc20rxxl1/2* (*rxxl1/2* in B) oder *cdc20ΔIR* (C) von dem induzierbaren *GAL1*-Promotor. Die Expression der *CDC20*-Derivate wurde in asynchron wachsenden Zellen, die endogen mit einem Epitop-markierte Versionen von *PDS1* (*PDS1-HA6*) und *CLB5* (*CLB5-FLAG3*) co-exprimierten,

durch Zugabe von Galaktose induziert. Vor ($t = 0$ h) und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Induktion wurden Proben entnommen und Proteinrohextrakte für die Westernblot-Analyse hergestellt. Der Nachweis der Cdc20-Derivate erfolgte über ein N-terminales Myc9-Epitop mit Hilfe eines Myc-spezifischen Antikörpers. Pds1-HA6 und Clb5-FLAG3 wurden mit Hilfe eines HA-spezifischen bzw. eines FLAG-spezifischen Antikörpers detektiert. Clb2 und Gcd11, das als Ladekontrolle diente, wurden mittels spezifischer Antisera nachgewiesen. Das Sternchen (*) markiert eine Kreuzreaktionsbande des FLAG-Antikörpers. Die Raute (#) kennzeichnet eine auf Grund von Phosphorylierung langsamere migrierende Version von Pds1-HA6. **(D – F)** Quantifizierung der Signalintensitäten der in der Westernblot-Analyse detektierten Proteine Pds1-HA6 (D), Clb5-FLAG3 (E) und Clb2 (F). Die gemessenen Signalintensitäten wurden auf das jeweilige Gcd11-Signal normiert und der Wert zum Zeitpunkt vor der Induktion ($t = 0$ h) gleich 1 gesetzt.

Im Gegensatz zur Mutation der RxxL-Motive führte die Deletion des C-terminalen IR-Motivs zu einer deutlichen Verminderung der Aktivität von Cdc20. So blieb die Überexpression des resultierenden *cdc20ΔIR*-Konstrukts ohne Einfluss auf die Stabilität der getesteten Substrate (Abb. 4.24 C – F). Diese Daten bestätigen die Vermutung, dass die RxxL-Motive im Vergleich zu dem IR-Motiv weniger bedeutend für die Fähigkeit von Cdc20 sind, den APC/C zu aktivieren.

Zusammengefasst konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die NTD von Cdc20 nach Überexpression, ebenso wie das Protein in voller Länge, den Abbau der Substrate Pds1 und Clb5 induzieren kann. Allerdings erfolgt die Destabilisierung der Substrate durch die NTD in geringerem Ausmaß und benötigt einen deutlich längeren Zeitraum als im Fall von Cdc20 in voller Länge. Darüber hinaus wurden Hinweise darauf gefunden, dass die RxxL-Motive nicht nur die Degradation von Cdc20 in der G1-Phase vermitteln, sondern möglicherweise auch einen positiven Beitrag zur Funktion von Cdc20 leisten.

4.4 Die Rolle der WD40-Domänen für die Spezifität der APC/C-Aktivatoren

Die Aktivatoren Cdc20 und Cdh1 binden den APC/C nicht nur zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Zellteilungszyklus, sondern scheinen zusätzlich unterschiedliche Spezifitäten gegenüber APC/C-Substraten aufzuweisen. So gelten in *S. cerevisiae* Securin (Pds1) und das S-Phase-Cyclin Clb5 als reine Cdc20-Substrate, da sie in *cdc20*-Mutanten nicht abgebaut werden und ihre Stabilität durch die Überexpression von *CDC20*, jedoch nicht durch die Überexpression von *CDH1*, beeinträchtigt wird (Visintin *et al.*, 1997; Schwab *et al.*, 2001). Dagegen konnten die Spindel-assoziierten Proteine Ase1 und Cin8, die Polo-Kinase Cdc5 oder der frühe Aktivator Cdc20 als Cdh1-Substrate identifiziert werden (Juang *et al.*, 1997; Charles *et al.*, 1998; Prinz *et al.*, 1998; Robbins und Cross, 2010a; Arnold *et al.*, 2015). Darüber hinaus scheint die Spezifität der Aktivatoren für manche Substrate zu überlappen (Burton und

Solomon, 2001) oder ist wie im Fall des B-Typ-Cyclins Clb2, das hauptsächlich durch Cdh1 für den Abbau markiert wird, unterschiedlich ausgeprägt. Während in frühen Arbeiten Cdh1 als der verantwortliche Aktivator für die Degradation von Clb2 identifiziert wurde (Visintin *et al.*, 1997; Schwab *et al.*, 2001), konnte in späteren Arbeiten auch ein geringer Beitrag des frühen Aktivators Cdc20 nachgewiesen werden (Yeong *et al.*, 2000; Wäsch und Cross, 2002; Lu *et al.*, 2014). Die molekulare Grundlage für die unterschiedliche Spezifität der Aktivatoren gegenüber APC/C-Substraten ist bislang nur unvollständig verstanden. Die zeitlich unterschiedliche Regulation der Aktivatoren kann hierbei nur zum Teil als Erklärung dienen. Cdc20 wird zwar in der späten Mitose selbst abgebaut und kann somit die Degradation später APC/C-Substrate nicht vermitteln, dies erklärt jedoch nicht, warum späte Substrate wie Ase1 oder Cdc5 nicht bereits in der frühen Mitose durch Cdc20 für den Abbau markiert werden. Aktuelle Strukturdaten zeigen, dass die Rezeptoren für D- und KEN-Boxen in den WD40-Domänen von Cdc20 und Cdh1 hoch konserviert sind (Chao *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013). Dies spricht gegen die Idee, dass D- und KEN-Boxen für die unterschiedliche Substratspezifität der Aktivatoren verantwortlich sein könnten. Vielmehr werden weitere Abbausignale in den APC/C-Substraten vermutet, die entweder mit weniger konservierten Bereichen der WD40-Domänen oder mit der NTD der Aktivatoren interagieren, um eine Aktivator-spezifische Erkennung zu ermöglichen. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Bedeutung der WD40-Domänen für die Substratspezifität der Aktivatoren zu erforschen.

4.4.1 Aktivator-Derivate benötigen die WD40-Domäne von Cdc20 für die Komplementation von *cdc20Δ*

Um die molekulare Grundlage für die unterschiedlichen Spezifitäten von Cdc20 und Cdh1 näher zu untersuchen, wurde auf Aktivator-Chimären zurückgegriffen, die in einer früheren Arbeit durch Austausch der C-terminalen WD40-Domänen hergestellt worden waren (Wegerer, 2004). Die Aktivator-Chimäre aus der NTD von Cdc20 und der CTD von Cdh1 wurde N20WD1 genannt, während das komplementäre Konstrukt aus NTD von Cdh1 und CTD von Cdc20 als N1WD20 bezeichnet wurde (Abb. 4.25).

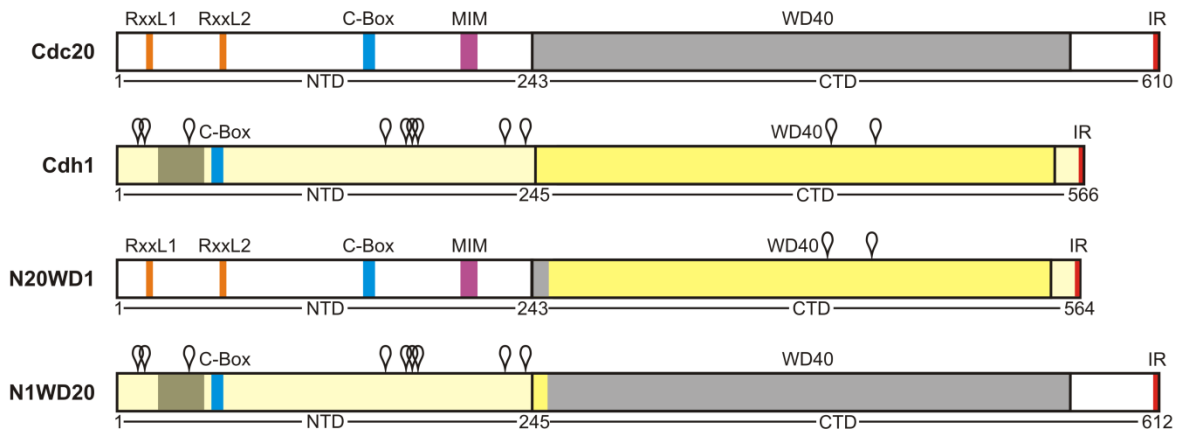


Abbildung 4.25: Schematische Darstellung der Chimären aus Cdc20 und Cdh1

Die Aktivator-Chimären N20WD1 und N1WD20 wurden durch Austausch der C-terminalen Domänen zwischen Cdc20 (Grundfarbe weiß) und Cdh1 (Grundfarbe blass-gelb) hergestellt (Wegerer, 2004). Die RxxL-Motive (orange), die NLS in Cdh1 (oliv), die C-Box (blau), das Mad2-Interaktionsmotiv in Cdc20 (MIM, magenta), die WD40-Domäne (grau in Cdc20 und kräftiges gelb in Cdh1) und das IR-Motiv (rot) sind durch farbige Kästen gekennzeichnet. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen in Cdh1 sind durch weiße Pins markiert. Die Zahlen geben Aminosäurepositionen an. NTD: N-terminale Domäne. CTD: C-terminale Domäne.

Die erste Charakterisierung der Konstrukte deutete an, dass sich die Chimären bezüglich der Bindung von Substraten tendenziell wie der Aktivator verhalten, dessen WD40-Domäne sie besitzen (Wegerer, 2004). So interagierte N20WD1 ebenso wie Cdh1 bevorzugt mit Clb2 und Spo12, während N1WD20 erhöhte Affinitäten zu den Cdc20-Substraten Clb5 und Pds1 zeigte. In der Fähigkeit, nach Überexpression den Abbau von APC/C-Substraten zu vermitteln, ähnelten N20WD1 und N1WD20 ebenfalls eher Cdh1 bzw Cdc20. Im Zuge der Charakterisierung der Chimären wurde zudem deren Fähigkeit getestet, die Deletion des essentiellen *CDC20*-Gens zu komplementieren (Wegerer, 2004). Dabei stellte sich heraus, dass keine der Aktivator-Chimären die Funktion von Cdc20 übernehmen konnte. Im Fall von N1WD20 konnte die Komplementationsfähigkeit jedoch hergestellt werden, wenn die inhibitorischen Cdk-Phosphorylierungsstellen in der von Cdh1 stammenden NTD durch Mutation entfernt wurden. Dies waren erste Hinweise darauf, dass die Spezifität der Aktivatoren möglicherweise von den WD40-Domänen ausgeht.

In dieser Arbeit stand die Untersuchung der Spezifität von Cdc20 im Vordergrund. Zunächst sollte in Komplementationsstudien die frühere Beobachtung, dass die WD40-Domäne von Cdc20 entscheidend für die Spezifität des Aktivators ist, reproduziert und mit weiteren Aktivator-Derivaten bestätigt werden. Die Aktivator-Konstrukte wurden zu diesem Zweck wie in Kapitel 4.3.2.1 beschrieben stabil in das Genom des heterozygot-diploiden *CDC20/cdc20Δ*-Stamms integriert und anschließend in Tetradenanalysen getestet, ob die

Aktivator-Konstrukte die Deletion von *CDC20* komplementieren konnten. Die Expression der Aktivator-Derivate erfolgte von ihren endogenen Promotoren, wobei sich der Promotor im Fall der Chimären nach der NTD des Konstrukts richtete. Vor der Tetradenanalyse wurde mittels PCR und Westernblot überprüft, in welcher Kopienzahl die integrierten Aktivator-Konstrukte in den ausgewählten Stämmen vorlagen (Abb. 8.13 im Anhang). Für den Nachweis im Westernblot waren die Derivate mit einem N-terminalen HA- oder HA3-Epitop versehen. Zunächst wurden Stämme mit einfacher Integration der Aktivator-Konstrukte für die Tetradenanalysen ausgewählt. Zusätzlich wurden die Komplementationsstudien mit Stämmen durchgeführt, die auf Grund von multiplen Integrationen eine deutlich erhöhte Expression der Konstrukte aufwiesen (mit dem Namenszusatz ++ in Abb. 8.13 im Anhang). Dadurch sollte die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass Derivate mit reduzierter Cdc20-Aktivität die Deletion von *CDC20* nur durch erhöhte Proteinmengen komplementieren können.

Als positive Referenz wurde die Komplementation von *cdc20Δ* durch ein *HA-CDC20*-Konstrukt getestet, das die Deletion von *CDC20* retten konnte (Abb. 4.26 A). So bildeten neben Sporen mit intaktem *CDC20*-Allel auch *cdc20Δ*-Sporen (Δ) Kolonien, wenn sie zusätzlich das *HA-CDC20*-Konstrukt (C) enthielten (grün markiert in Abb. 4.26 A). Dagegen waren *cdc20Δ*-Sporen, die keine Kopie von *HA-CDC20* trugen, nicht lebensfähig. Da sich das Wachstum der durch *HA-CDC20* geretteten *cdc20Δ*-Zellen nicht von dem Wachstum der Wildtyp-Sporen (ohne Symbol) unterschied, ist die Komplementation durch *HA-CDC20* als vollständig anzusehen.

Im Gegensatz dazu konnte weder ein *HA3-CDH1*-Konstrukt noch eine der Chimären *N1WD20* oder *N20WD1* die essentielle Funktion von *CDC20* übernehmen, sodass in den Tetradenanalysen nur die haploiden Nachkommen anwuchsen, die ein intaktes *CDC20*-Allel trugen (Abb. 4.26 B-D). Sporen mit einer Kombination von *cdc20Δ* und einem der Aktivator-Konstrukte traten dagegen nicht auf, was mit früheren Ergebnissen im Einklang steht. Auch eine erhöhte Expression von *HA3-CDH1*, *HA-N20WD1* oder *HA3-N1WD20* ermöglichte keine Komplementation von *cdc20Δ* (Abb. 8.14 A – C).

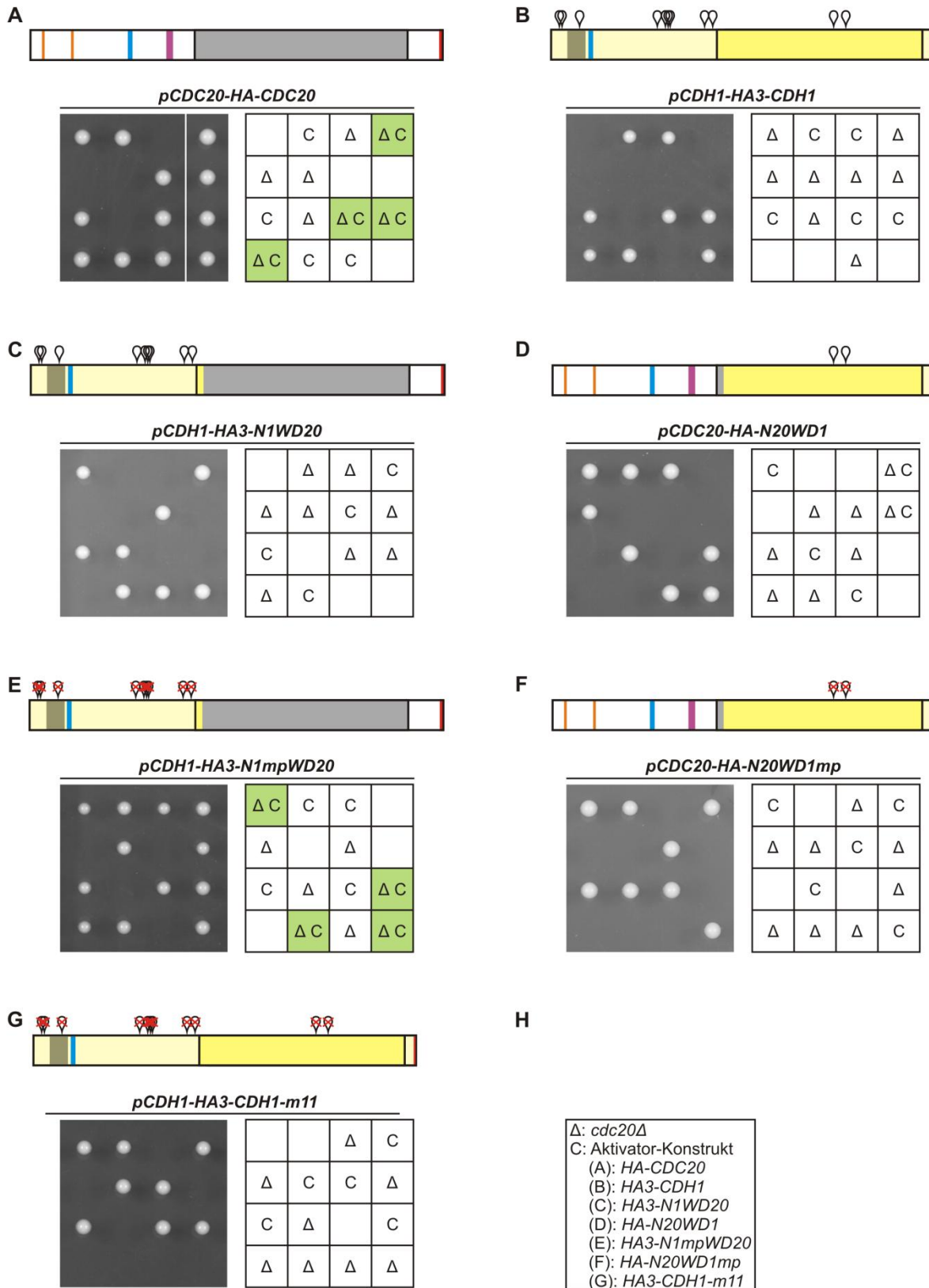


Abbildung 4.26: Komplementation von *cdc20* durch Cdc20, Cdh1 und Aktivator-Chimären

(A – G) Tetradenanalysen zur Komplementation von *cdc20Δ* durch *CDC20* (A), *CDH1* (B), *N1WD20* (C), *N20WD1* (D), *N1mpWD20* (E), *N20WD1mp* (F) oder *CDH1-m11* (G). Heterozygot-diploide *CDC20/cdc20Δ*-Zellen, welche die angegebenen Aktivator-Konstrukte von dem *CDC20*-Promotor (A, D und F) oder dem *CDH1*-Promotor (B, C, E und G) exprimierten, wurden zur Sporulation gebracht und die vier haploiden Nachkommen der entstandenen Tetraden wurden auf einer Vollmediumsplatte vereinzelt. Das Wachstum der Sporen bei 30°C

wurde nach 48 h dokumentiert und anschließend die Genotypen bestimmt. Es sind die Sporen von jeweils vier repräsentativen Tetraden in vertikaler Orientierung gezeigt. Die nebenstehende Tabelle gibt die Auswertung der relevanten Genotypen wieder. Grün hinterlegte Felder markieren eine erfolgreiche Komplementation. Zur Veranschaulichung befinden sich über den Tetraden schematische Darstellungen der jeweiligen Konstrukte basierend auf Abbildung 4.25. Die RxxL-Motive (orange), die C-Box (blau), das MIM (magenta), die WD40-Domäne (grau in Cdc20 und kräftiges gelb in Cdh1) und das IR-Motiv (rot) sind durch farbige Kästen hervorgehoben. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen in Cdh1 sind mit weißen Pins markiert. Rote Kreuze kennzeichnen die Mutation der Phosphat-akzeptierenden Aminosäureresten zu Alaninresten (S/TP zu AP). **(H)** Legende zur Auswertung der Genotypen in A – G.

In den von Cdh1 stammenden Anteilen der Chimären N20WD1 und N1WD20 befinden sich Cdk-Phosphorylierungsstellen, deren Phosphorylierung die Bindung von Cdh1 an den APC/C in der frühen Mitose verhindert (Kapitel 4.1). Da die Aktivität von Cdc20 jedoch in der frühen Mitose gefordert ist, wäre es denkbar, dass Cdh1, N20WD1 und N1WD20 die Funktion von *CDC20* auf Grund der inhibitorischen Phosphorylierung nicht übernehmen können. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden die Komplementation von *cdc20Δ* mit Konstrukten getestet, denen die Cdk-Phosphorylierungsstellen durch Mutation entfernt wurden. Dabei konnte die frühere Beobachtung bestätigt werden, dass die Deletion von *CDC20* durch die Chimäre *N1mpWD20*, die durch die Entfernung der Cdk-Phosphorylierungsstellen in der von Cdh1 stammenden NTD von N1WD20 hergestellt wurde, gerettet werden kann (Abb. 4.26 E). Die Komplementation durch das *N1mpWD20*-Konstrukt war bereits bei einfacher Integration vollständig, da die durch *N1mpWD20* geretteten *cdc20Δ*-Sporen keine Wachstumsdefekte gegenüber Wildtyp-Sporen zeigten (Abb. 4.26 E). Daraus lässt sich schließen, dass die NTD von Cdc20 für die essentielle Funktion des Aktivators verzichtbar ist und durch die NTD von Cdh1 ersetzt werden kann. Allerdings verhindert die Phosphorylierung der regulatorischen NTD, dass N1WD20, das ansonsten ein funktionelles Cdc20-Derivat darstellt, die Funktion von Cdc20 in der frühen Mitose übernehmen kann.

Dagegen ermöglichte die Mutation der Cdk-Phosphorylierungsstellen in Cdh1 oder N20WD1 keine Komplementation von *cdc20Δ*. Die betreffenden Konstrukte *CDH1-m11* (Zachariae *et al.*, 1998) und *N20WD1mp*, in welchem die Cdk-Motive der von Cdh1 stammenden WD40-Domäne mutiert wurden, retteten die Deletion von *CDC20* weder nach einfacher Integration (Abb. 4.26 F und G) noch in höherer Kopienzahl (Abb. 8.14 D und E).

Diese Daten belegen, dass sich die WD40-Domänen von Cdc20 und Cdh1 trotz ihrer hohen Ähnlichkeit funktionell unterscheiden und die WD40-Domäne von Cdc20 für die Funktion von Cdc20 essentiell ist.

4.4.2 Die Aktivator-Chimäre N1mpWD20 ist ein konstitutiv aktives Cdc20-Derivat

In den Tetradenanalysen komplementierte die Chimäre *N1mpWD20* die Deletion von *CDC20* ohne sichtbaren Wachstumsdefekte (Abb. 4.26 E). Um die Vollständigkeit der Komplementation zu untersuchen, sollte die Zellzyklusprogression von *cdc20Δ*-Zellen, die durch *HA3-N1mpWD20* gerettet wurden, mit der von durch *HA-CDC20* geretteten *cdc20Δ*-Zellen verglichen werden. Hierzu wurden die Zellen durch das Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase arretiert und anschließend synchron in den Zellteilungszyklus entlassen. Um die Ähnlichkeit von N1mpWD20 zu Cdc20 zu charakterisieren, wurde die Fluktuation der Cdc20-Substrate Securin (Pds1) und Clb5 in Westernblot-Analysen verfolgt. Zusätzlich wurden die Proteinlevel des G1-spezifischen Cdk-Inhibitors Sic1 und des mitotischen Cyclins Clb2 nachgewiesen und darüber hinaus der DNA-Gehalt der Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt, um den Zellzyklusverlauf der beiden Stämme zu dokumentieren.

In den durch *HA-CDC20* geretteten *cdc20Δ*-Zellen fluktuierten die untersuchten Proteine in bekannter Weise (Abb. 4.27 A). Während des G1-Arrests konnten lediglich hohe Mengen des Cdk-Inhibitors Sic1 detektiert werden, während Clb5, Clb2, Pds1 und Cdc20 nicht oder nur sehr schwach nachzuweisen waren (Abb. 4.27 A). Bereits 15 min nach Entlassen aus dem G1-Arrest nahm das Signal von Sic1 ab und erreichte ein Minimum nach 75 min. Die Proteinlevel des S-Phase-Cyclins Clb5 stiegen 30 min nach Verlassen des G1-Arrestes an und waren nach 60 min maximal. Übereinstimmend mit der Bedeutung von Clb5 für die DNA-Replikation (Epstein und Cross, 1992; Schwob und Nasmyth, 1993) konnte eine Zunahme des DNA-Gehalts und damit der Eintritt in die S-Phase kurz nach dem Anstieg der Clb5-Level beobachtet werden (45 min). Zu diesem Zeitpunkt erhöhten sich auch die Proteinmengen von Pds1 und nach 90 min hatten nahezu alle Zellen ihr Erbgut verdoppelt und lagen mit zweifachem DNA-Gehalt (2C) vor. Die Proteinlevel von Pds1 fielen leicht verzögert zu Clb5 nach 105 min wieder ab und, im Einklang mit der Notwendigkeit von Cdc20 für den Abbau von Clb5 und Pds1, war Cdc20 nach 90 min erstmals sichtbar nachzuweisen. Das Signal für HA-Cdc20 ähnelte in seinem Auftreten der Fluktuation des mitotischen Cyclins Clb2, war jedoch deutlich schwächer zu detektieren.

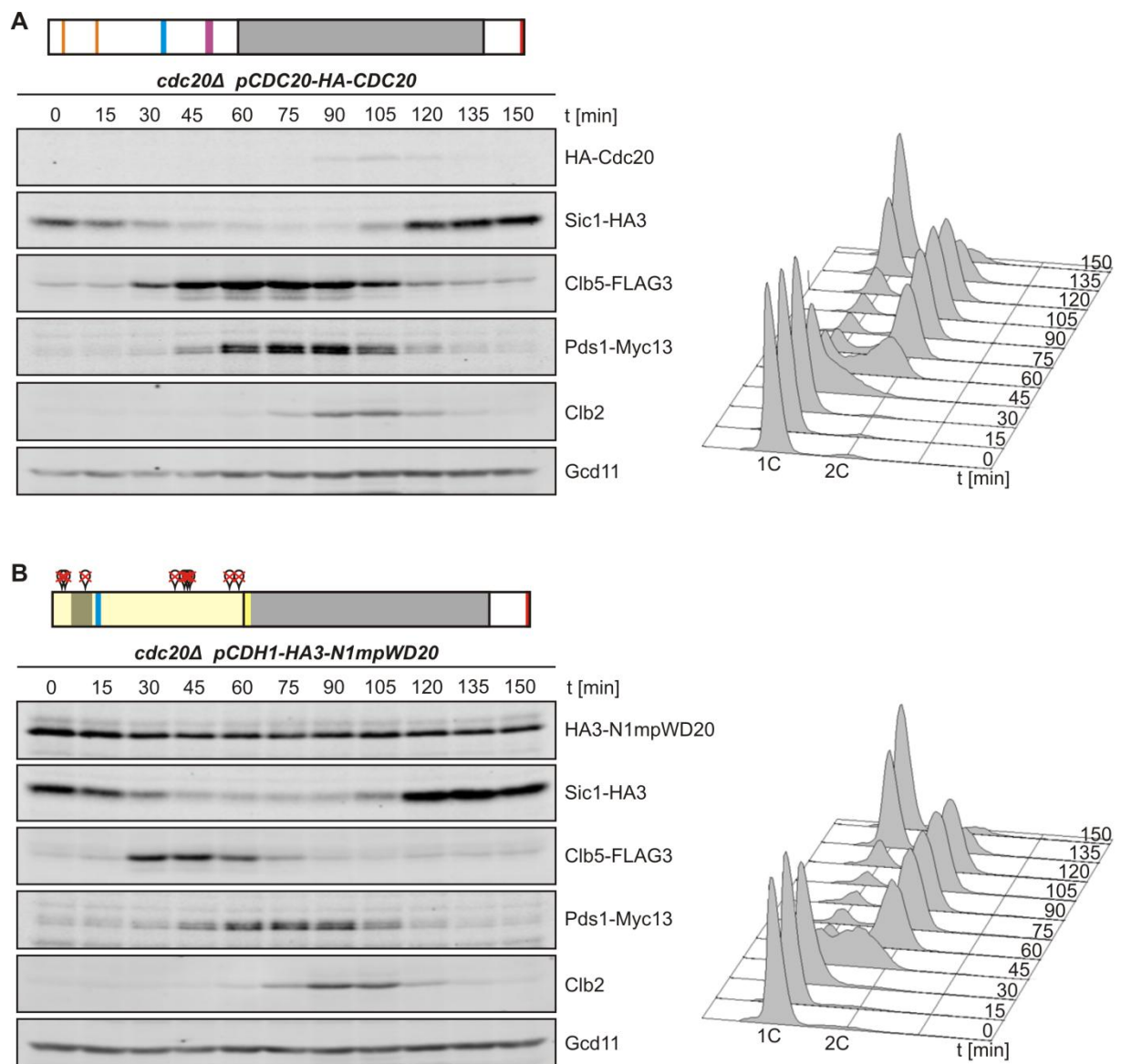


Abbildung 4.27: Zellzyklusprogression von *CDC20*- und *N1mpWD20*-Zellen

(A und B) Westernblot-Analyse von Zellzyklus-Markern und DNA-Profil von synchron wachsenden *CDC20*- (A) und *N1mpWD20*-Zellen (B). *cdc20Δ*-Zellen, die entweder durch ein *CDC20*-Konstrukt oder die Chimäre *N1mpWD20* gerettet wurden (Abb. 4.26), wurden mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase arretiert und anschließend durch Umsetzen in Pheromon-freies Medium synchron in den Zellzyklus entlassen (t = 0 min). Nach 70 min erfolgte eine erneute Zugabe von α -Faktor, um die Zellen nach Durchlaufen einer Zellzyklusrunde wieder in der G1-Phase zu arretieren. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen entnommen und sowohl Proteinrohextrakte für die Westernblot-Analyse (links) hergestellt als auch Zellen mit Sytox-Green für die Messung des DNA-Gehalts (rechts) gefärbt. Die Expression des *CDC20*-Konstrukts und der *N1mpWD20*-Chimäre erfolgte von dem *CDC20*-Promotor bzw. von dem *CDH1*-Promotor. Die Zellen co-exprimierten endogen mit einem Epitop-markierte Versionen von *CLB5* (*CLB5-FLAG3*) und *PDS1* (*PDS1-MYC13*). Zusätzlich exprimierten die Zellen eine mit einem HA3-Epitop markierte Version von *SIC1* unter Kontrolle des *SIC1*-Promotors. Der Nachweis von HA-Cdc20, HA3-N1mpWD20 sowie HA3-Sic1 im Westernblot erfolgte mit Hilfe eines HA-spezifischen Antikörpers. Clb5-FLAG3 und Pds1-Myc13 wurden mit einem FLAG- bzw. Myc-spezifischen Antikörper detektiert. Die Detektion von Clb2 und Gcd11, das als Ladekontrolle diente, erfolgte mit Hilfe spezifischer Antiseren. Zur Veranschaulichung sind über den Westernblots schematische Darstellungen der Konstrukte basierend auf den Abbildungen 4.25 und 4.26 gezeigt. 1C: einfacher DNA-Gehalt. 2C: zweifacher DNA-Gehalt.

Die Proteinlevel beider Proteine begannen zur selben Zeit (120 min) wieder abzunehmen, was konsistent mit ihrer gemeinsamen Degradation durch APC/C-Cdh1 vermittelte Ubiquitinierung ist. Zusammen mit dem zeitgleichen Wiederanstieg von Sic1 deutete dies auf den Austritt aus der Mitose hin, sodass nach 150 min die Mehrzahl der Zellen wieder mit einfachem DNA-Gehalt (1C) in der G1-Phase vorlag.

Die Fluktuation der Zellzyklusmarker und das DNA-Profil der *cdc20Δ*-Zellen, die aus der Komplementation durch die Chimäre *N1mpWD20* resultierten, waren sehr ähnlich zu dem beobachteten Zellzyklusprofil der durch *HA-CDC20* geretteten *cdc20Δ*-Zellen (Abb. 4.27 B). Dennoch konnten subtile Unterschiede in der Zellzyklusprogression der beiden Stämme festgestellt werden. Zunächst fiel auf, dass die Proteinlevel der Chimäre *N1mpWD20* im Gegensatz zu *HA-Cdc20* nicht fluktuierten sondern im Verlauf des Zellzyklus konstant blieben. Lediglich nach Verlassen des G1-Arrests schienen die detektierten Proteinmengen leicht abzunehmen. Somit ist die von *Cdc20* bekannte, Zellzyklus-regulierte Expression und Stabilität im Fall von *N1mpWD20* in Folge des Austausches der regulatorischen NTD und des Promotors von *Cdc20* durch die äquivalenten Elemente von *Cdh1* verloren gegangen.

Da *N1mpWD20* die inhibitorischen Phosphorylierungsstellen in der von *Cdh1* stammenden NTD fehlen (Kapitel 4.1), ist anzunehmen, dass die Chimäre in allen Zellzyklusphasen an den APC/C binden und den Abbau von *Cdc20*-Substraten induzieren kann. Eine denkbare Konsequenz einer Aktivierung des APC/C durch *N1mpWD20* in der G1-Phase wäre eine verzögerte Akkumulation von *Clb5*, wodurch der Eintritt in die S-Phase verspätet erfolgen sollte. Dies war in den durch *N1mpWD20* geretteten *cdc20Δ*-Zellen jedoch nicht der Fall. Im Gegenteil deutete das DNA-Profil der *N1mpWD20*-Zellen an, dass der Eintritt in die S-Phase sogar früher als in *HA-CDC20* geretteten Zellen stattfindet (Abb. 4.27 B). So konnten bereits 45 min nach Entlassen aus dem G1-Arrest *N1mpWD20*-Zellen mit zweifachem DNA-Gehalt nachgewiesen werden. Die Abnahme von *Sic1* und der Anstieg von *Clb5* nach dem Entlassen in den Zellzyklus waren vergleichbar zu der Situation in *HA-CDC20*-Zellen (Abb. 4.27 A und B). Allerdings akkumulierte *Clb5* in *N1mpWD20*-Zellen weniger stark und die Proteinlevel verringerten sich bereits nach 60 min wieder, sodass *Clb5* für deutlich kürzere Zeit im Zellzyklus persistierte als in *HA-CDC20*-Zellen. Für *Pds1* konnte ebenfalls ein geringerer Anstieg der Proteinlevel in *N1mpWD20* geretteten Zellen dokumentiert werden, dennoch zeigte *Pds1* grundsätzlich eine identische Fluktuation wie in *HA-CDC20*-Zellen. Die reduzierte Akkumulation der *Cdc20*-Substrate und der verfrühte Abbau von *Clb5* deuten daraufhin,

dass das in frühen Zellzyklusphasen vorhandene N1mpWD20 bereits aktiv ist. Dass Clb5 und Pds1 trotz der konstitutiven Anwesenheit von N1mpWD20 in gewohntem Muster im Zellzyklus erschienen, könnte auf deren Zellzyklus-regulierten Expression beruhen, die stark genug zu sein scheint, um dem durch N1mpWD20 vermittelten Abbau entgegen zu wirken. Das frühere Verschwinden von Clb5 gegenüber Pds1 in *N1mpWD20*-Zellen ließe sich in diesem Zusammenhang dadurch erklären, dass sich die Expression von Pds1 möglicherweise über einen längeren Zeitraum erstreckt als im Fall von Clb5. Die geringe Anreicherung von Clb5 in durch N1mpWD20 geretteten *cdc20Δ*-Zellen scheint hinreichend zu sein, um die S-Phase zu induzieren. Im Gegensatz zu Clb5 und Pds1 unterschied sich die Fluktuation von Clb2 in *N1mpWD20*-Zellen nicht von dem beobachteten Muster in *HA-CDC20* geretteten Zellen (Abb. 4.27 A und B). Daraus lässt schließen, dass sich die kontinuierliche Cdc20-Aktivität von N1mpWD20 nicht auf die Clb2-Level auswirkt. Gleichzeitig wird dadurch die Annahme bekräftigt, dass die WD40-Domänen von Cdc20 und Cdh1 unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen und Clb2 durch die WD40-Domäne von Cdc20 nicht effizient erkannt wird. Darüber hinaus konnte weder an Hand des DNA-Profiles noch in der Zu- und Abnahme der Sic1- und Clb2-Level ein Einfluss von N1mpWD20 auf den Austritt aus der Mitose beobachtet werden. Somit scheint die persistierende Aktivität von N1mpWD20 die Degradation von Cdh1-Substraten am Ende der Mitose nicht zu stören.

Durch den Austausch der N-terminalen Domäne fehlt der Chimäre N1mpWD20 gegenüber Cdc20 nicht nur das Degron für die Cdh1 vermittelte Degradation in der G1-Phase (Kapitel 4.2), sondern auch das MIM zur Regulation durch das Spindelkontrollsystem (Pan und Chen, 2004; Chao *et al.*, 2012; Lara-Gonzalez *et al.*, 2012). In der Tat waren Zellen, in denen *cdc20Δ* durch N1mpWD20 komplementiert wurde, sensitiv gegenüber dem Spindelgift Benomyl (Wegerer, 2004). Dies deutete bereits an, dass das Spindelkontrollsystem in *N1mpWD20*-Zellen möglicherweise nicht mehr greift und die Zellen nicht in der Lage sind, den Zellzyklus bei Spindelschäden anzuhalten. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurden *N1mpWD20*-Zellen mit Hilfe des Paarungspheromons α -Faktor in der G1-Phase synchronisiert und anschließend in Medium kultiviert, das die Spindel schädigende Substanz Nocodazol enthält. Zur Analyse der Zellzyklusprogression wurden die Marker Sic1, Pds1, Clb5 und Clb2 in Westernblot-Analysen nachgewiesen und der DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Kontrolle diente der *cdc20Δ*-Stamm, in welchem die Deletion von *CDC20* durch das *HA-CDC20*-Konstrukt komplementiert wurde.

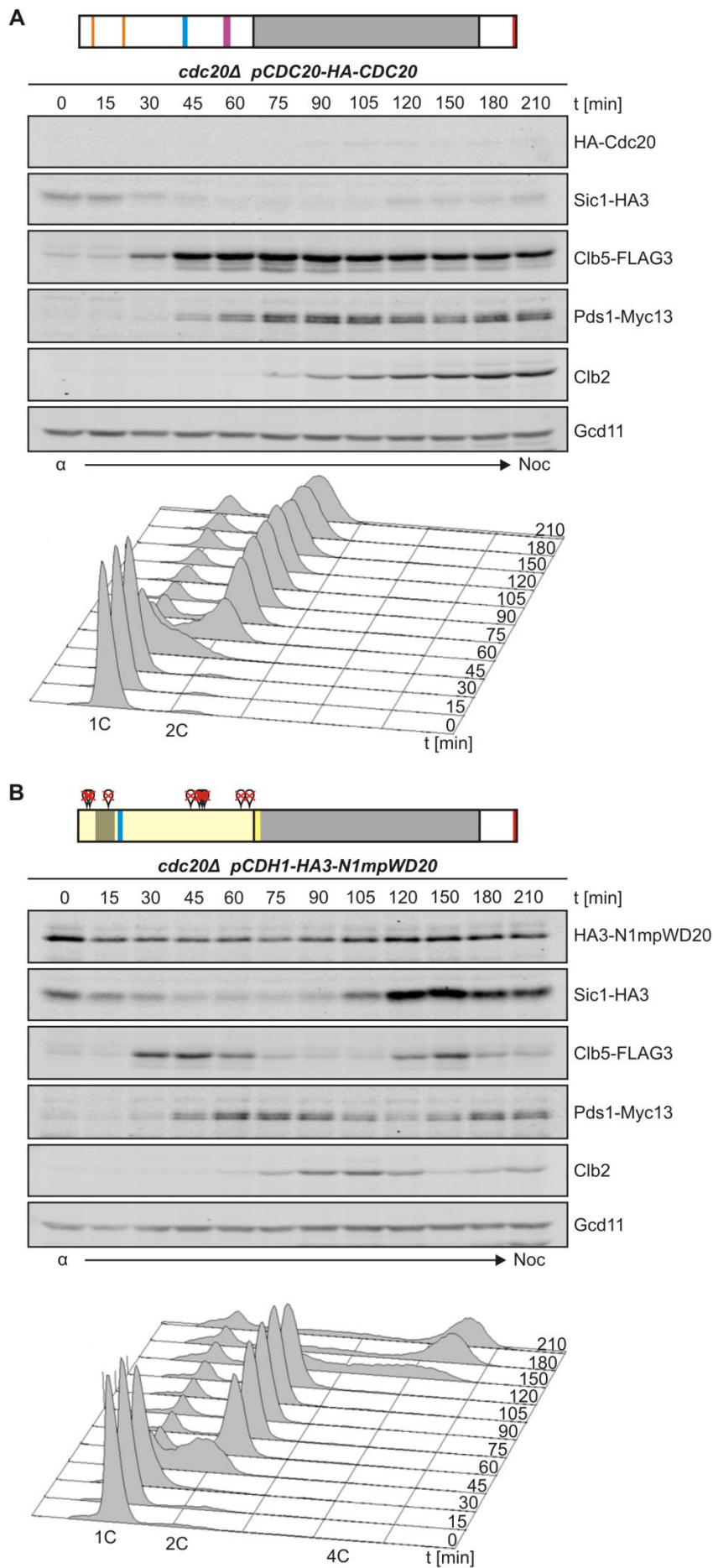


Abbildung 4.28: Zellzyklusprogression von Nocodazol-arretierten *CDC20*- und *N1mpWD20*-Zellen

(A und B) Westernblot-Analyse von Zellzyklus-Markern und DNA-Profil von synchron wachsenden *CDC20*- (A) und *N1mpWD20*-Zellen (B) nach Aktivierung des SAC durch Nocodazol. *cdc20Δ*-Zellen, die entweder durch ein *CDC20*-Konstrukt oder die Chimäre *N1mpWD20* gerettet wurden (Abb. 4.26), wurden mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen in mit Nocodazol-versetztes Medium synchron in den Zellzyklus entlassen ($t = 0$ min). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen entnommen und sowohl Proteinrohextrakte für die Westernblot-Analyse (oben) hergestellt als auch Zellen mit Sytox-Green für die Messung des DNA-Gehalts (unten) gefärbt. Die Expression des *CDC20*-Konstrukts und der *N1mpWD20*-Chimäre erfolgte von dem *CDC20*-Promotor bzw. von dem *CDH1*-Promotor. Die Zellen co-exprimierten endogen mit einem Epitop-markierte Versionen von *CLB5* (*CLB5-FLAG3*) und *PDS1* (*PDS1-MYC13*). Zusätzlich exprimierten die Zellen eine mit einem HA3-Epitop markierte Version von *SIC1* unter Kontrolle des *SIC1*-Promotors. Der Nachweis von HA-Cdc20, HA3-N1mpWD20 sowie HA3-Sic1 im Westernblot erfolgte mit Hilfe eines HA-spezifischen Antikörpers. Clb5-FLAG3 und Pds1-Myc13 wurden mit einem FLAG- bzw. Myc-spezifischen Antikörper detektiert. Die Detektion von Clb2 und Gcd11, das als Ladekontrolle diente, erfolgte mit Hilfe spezifischer Antiseren. Zur Veranschaulichung sind über den Westernblots schematische Darstellungen der Konstrukte basierend auf Abbildungen 4.25 und 4.26 gezeigt. 1C: einfacher DNA-Gehalt. 2C: zweifacher DNA-Gehalt. 4C: vierfacher DNA-Gehalt.

Sowohl die *HA-CDC20*- als auch die *N1mpWD20*-Zellen traten nach Entlassen aus dem G1-Arrest zunächst regulär in den Zellteilungszyklus ein (Abb. 4.28). Nach der Abnahme der Sic1-Level stiegen die Proteinmengen von Clb5, Pds1 und Clb2 in beiden Stämmen sequentiell an. Zudem ergab die Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie, dass beide Stämme ihre DNA mit normaler Kinetik replizierten. Dabei bestätigte sich die Beobachtung (Abb. 4.27), dass die *N1mpWD20*-Zellen etwas früher als die durch *HA-CDC20* geretteten Zellen in die S-Phase eintreten (Abb. 4.28 A und B). In *HA-CDC20*-Zellen blieben die Proteinlevel von Clb5, Pds1 und Clb2 nach ihrer Akkumulation stabil und nahmen im Verlauf des Experimentes nicht wieder ab (Abb. 4.28 A). Lediglich die Proteinmengen von Clb5, für das eine gewisse Degradation in Nocodazol-arretierten Zellen beschrieben wurde (Lu *et al.*, 2014), sanken mit zunehmender Dauer des Nocodazol-Arrestes langsam ab. HA-Cdc20 war nach 90 min schwach zu detektieren und reicherte sich nach 105 min nicht weiter an, was auf die Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen Neusynthese und SAC-abhängiger Degradation des Proteins hindeutet. Bis zum Ende des Experiments lagen die *HA-CDC20*-Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt vor, was zusammen mit der Stabilität der APC/C-Substrate konsistent mit einem Arrest vor der Anaphase ist. Im Gegensatz zur Situation in *HA-CDC20*-Zellen fluktuieren Pds1 und die Cycline in *N1mpWD20*-Zellen trotz der Nocodazol-Behandlung wie in unbehandelten Zellen (Abb. 4.27 B und 4.28 B). Zudem wurde ein Wiederanstieg des Cdk-Inhibitors Sic1 nach 105 min beobachtet (Abb. 4.28 B). Im weiteren Verlauf nahmen die Sic1-Level wieder ab und Pds1, Clb5 und Clb2 re-akkumulierten, was auf

einen Eintritt in den nächsten Zellteilungszyklus hindeutet. An Hand des DNA-Profiles der Zellen war zu erkennen, dass die Zellen ohne Trennung der replizierten Chromosomen aus der Mitose austraten. Der Wiederanstieg von Clb5 führte in der Folge zu Re-Replikation und der Entstehung von Zellen mit vierfachem DNA-Gehalt (4C).

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Chimäre N1mpWD20 nicht durch den SAC inhibiert werden kann und *N1mpWD20*-Zellen auch in Anwesenheit von Spindelschäden den Zellteilungszyklus durchlaufen. Somit ist die Chimäre N1mpWD20 ein Cdc20-ähnlicher Aktivator, der jedoch weder durch Proteindegradation, Phosphorylierung, das Spindelkontrollsystem oder auf Ebene der Expression reguliert wird und infolgedessen ein konstitutiv aktives Cdc20-Derivat darstellt.

4.4.3 Aminosäuren im Bereich des KEN-Box-Rezeptors und der A-Motiv-Bindestelle tragen zur Spezifität der Aktivatoren bei

Die Studien zur Komplementation von *cdc20Δ* (Kapitel 4.4.1) haben gezeigt, dass die WD40-Domäne von Cdc20 entscheidend für die Funktion von Cdc20 ist und nicht durch die WD40-Domäne von Cdh1 ersetzt werden kann. Folglich unterscheiden sich die WD40-Domänen von Cdh1 und Cdc20 trotz der hohen Ähnlichkeit und können als Ursprung für die unterschiedlichen Spezifitäten der Aktivatoren angesehen werden. Um Bereiche oder Positionen in den WD40-Domänen zu identifizieren, welche für die Spezifitäten der Aktivatoren ursächlich sind, wurde ein genetisches Screening-System auf Basis der essentiellen Funktion von *CDC20* entwickelt. Als Ausgangspunkt diente die Chimäre N20WD1, die durch Austausch der WD40-Domäne von Cdc20 durch die WD40-Domäne von Cdh1 entstanden war und die Deletion von *CDC20* nicht komplementieren konnte (Abb. 4.26 D). Mit Hilfe einer fehleranfälligen PCR-Amplifikation (*error-prone PCR*) wurden zufällige Mutationen in die von Cdh1 stammende WD40-Domäne eingeführt und anschließend getestet, ob die entstandenen N20WD1-Mutanten ein Wachstum in Abwesenheit von Cdc20 erlauben. Hierzu wurden die mutagenisierten *N20WD1*-Konstrukte unter die Kontrolle des *CDC20*-Promotors gestellt und über ein ARS/CEN-Plasmid in einen Stamm eingebracht, in welchem die Expression von *CDC20* unter Kontrolle des durch Methionin abschaltbaren *MET3*-Promotors stand. Die essentielle Aufgabe von Cdc20 in *S. cerevisiae* besteht darin, in der frühen Mitose den Abbau von Securin (Pds1) und des S-Phase-Cyclins Clb5 zu vermitteln (Thornton und Toczyski, 2003). Um die Screening-Bedingungen nicht zu stringent zu

gestalten, wurde das *CLB5*-Gen in dem Screening-Stamm deletiert (*clb5Δ pMET3-HA3-CDC20*). Dadurch konzentrierte sich die Suche auf Mutationen in *N20WD1*, welche die Degradation von Pds1 in Abwesenheit von *CDC20* ermöglichen.

Die WD40-Domäne von *N20WD1* wurde in zwei separaten Ansätzen (Kapitel 6.9) mutagenisiert und der Screening-Stamm mit den entstandenen Konstrukten transformiert. Dabei wurden zunächst 30 Klone erhalten, die auf Selektivplatten mit Methionin anwuchsen und somit in Abwesenheit von Cdc20 lebensfähig waren. Nach der Isolation der ARS/CEN-Plasmide aus den Transformanden wurde der Screening-Stamm mit diesen erneut transformiert, wodurch letztlich 14 Mutanten identifiziert werden konnten, die nach Abschalten von *CDC20* reproduzierbar Kolonien bildeten (Tabelle 8.1 im Anhang).

Das Wachstum der Mutanten mit den höchsten Kolonienzahlen wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe präziser untersucht und die betreffenden *N20WD1*-Allele sequenziert (Abb. 4.29). In den Wachstumstests dienten *CDC20* und das nicht-mutierte Allel von *N20WD1* als Kontrollkonstrukte, die ebenfalls vom *CDC20*-Promotor auf einem ARS/CEN-Plasmid exprimiert wurden. Während Zellen, die das *N20WD1*-Plasmid enthielten, nur auf Medium ohne Methionin (permissiv, Cdc20 vorhanden) Wachstum zeigten und in Anwesenheit von Methionin (restriktiv, Cdc20 abwesend) nicht lebensfähig waren, wuchsen Zellen mit dem *CDC20*-Plasmid gleichermaßen auf Selektivplatten mit und ohne Methionin (Abb. 4.29). In den sequenzierten *N20WD1*-Allelen variierte die Anzahl der Punktmutationen, die zum Austausch einer Aminosäure an der entsprechenden Stelle führten, von eins bis sechs. Der Austausch einer einzelnen Aminosäure trat in zwei Allelen (M1 und M3) auf und ermöglichte jeweils ein minimales Wachstum in Abwesenheit von Cdc20. Eine höhere Anzahl an Mutationen führte dabei nicht zwangsweise zu einer verbesserten Proliferation der Zellen unter restriktiven Bedingungen. Die Klone M23, in welchem vier Aminosäuren im Vergleich zu *N20WD1* ausgetauscht waren, und M26 (zwei Aminosäuren verändert) wuchsen in Abwesenheit von Cdc20 schlechter als die Klone mit einer einzelnen Punktmutation. Dagegen zeigte die Mutante M21 durch den Austausch von Aminosäuren an vier Positionen ein moderates Wachstum unter den restriktiven Bedingungen. Die Klone M22 und M29, in denen zwei bzw. sechs Aminosäuren verändert waren, wuchsen nach Abschalten von *CDC20* nahezu identisch wie in Anwesenheit von Cdc20. Dies zeigt, dass die gefundenen Mutationen sich in ihrer Fähigkeit, das *N20WD1*-Konstrukt in einen Cdc20-ähnlicheren Aktivator umzuwandeln, qualitativ unterscheiden.

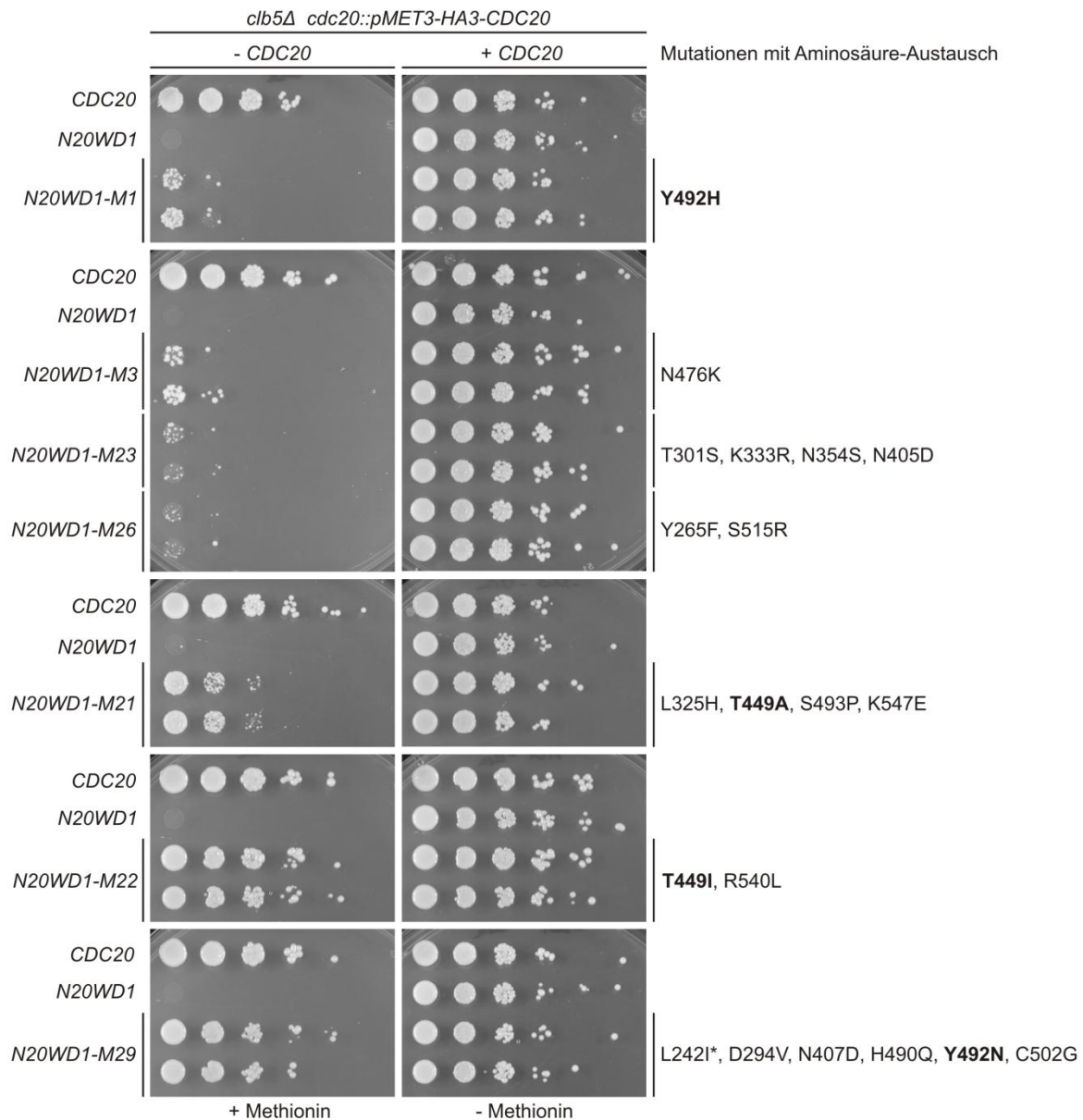


Abbildung 4.29: Mutationen in der WD40-Domäne von N20WD1, die ein Wachstum in Abwesenheit von Cdc20 und Clb5 ermöglichen (WD40-Spezifitäts-Screen)

Wachstum von *clb5Δ*-Zellen nach Abschaltung von *CDC20* und Expression verschiedener *N20WD1*-Versionen mit Mutationen in der WD40-Domäne von Cdh1. Mittels *Error-Prone*-PCR wurden zufällig Mutationen in den für die WD40-Domäne kodierenden Bereich eines *pCDC20-HA-N20WD1*-Konstrukts eingeführt, das sich auf einem ARS/CEN-Plasmid befand. Die Plasmide mit den mutagenisierten *N20WD1*-Konstrukten wurden in einen *clb5Δ*-Stamm eingebracht, in welchem die Expression des endogenen *CDC20* unter Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotors steht (*cdc20Δ::pMET3-HA3-CDC20*). Transformanten, die auf Selektivplatten mit Methionin (restriktiv, keine Expression von *CDC20*) Wachstum zeigten, wurden zwei Tage in Flüssigmedium ohne Methionin (permissiv, *CDC20* exprimiert) bis zur stationären Phase kultiviert. Die Stämme wurden anschließend in Form einer Verdünnungsreihe mit 1:10-Schritten ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml auf Selektionsplatten mit Methionin (restriktiv) oder ohne Methionin (permissiv) getropft und 48 h bei 30°C inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die entweder *CDC20* oder *N20WD1* von einem ARS/CEN-Plasmid exprimierten. Das Flüssigmedium und die Selektionsplatten enthielten kein Uracil, um einen Verlust der ARS/CEN-Plasmide zu verhindern. Auf der rechten Seite sind die Mutationen der *N20WD1*-Derivate aufgelistet, die zu einer Veränderung der Aminosäuren an den angegebenen Positionen führten. Aminosäurepositionen, die mehrfach

in verschiedenen Konstrukten betroffen waren, sind fett gedruckt. Die mit einem Sternchen versehene Mutation L242I betrifft eine Aminosäureposition in der von Cdc20 stammenden, N-terminalen Domäne.

Insgesamt wurden 20 verschiedene, Aminosäure-verändernde Mutationen in den *N20WD1*-Allelen identifiziert. Erstaunlicherweise waren zwei Positionen, Threonin 449 und Tyrosin 492, mehrmals betroffen und wurden in jeweils zwei unabhängigen Klonen verändert vorgefunden (fett gedruckt in Abb. 4.29), was für eine bedeutende Rolle dieser Aminosäuren für die Spezifität der Aktivatoren spricht. Das Tyrosin an Position 492 (Y492) war einerseits als einzige Aminosäure in der Mutante M1 zu Histidin mutiert und wurde zudem als eine von sechs Mutationen in der M29-Mutante gefunden (Y492N), welche ein gutes Wachstum in Abwesenheit von Cdc20 aufwies. Das Threonin 449 (T449) war in den ebenfalls gut wachsenden Mutanten M21 und M22 zu den hydrophoben Aminosäuren Alanin bzw. Isoleucin verändert und lag in beiden Fällen zusammen mit weiteren Positionen mutiert vor. Ein Sequenzvergleich zwischen Cdc20- und Cdh1-Orthologen aus verschiedenen Organismen ergab, dass das T449 in der WD40-Domäne aller untersuchten Aktivatoren hoch konserviert ist mit Ausnahme von Cdc20 aus *S. cerevisiae*, das an dieser Position ein Glutamin (Q) aufweist (Abb. 4.30 A). Die zweite Position, Y492, ist in Cdh1-Orthologen ebenfalls konserviert und in Cdc20-Orthologen befindet sich an entsprechender Stelle die verwandte Aminosäure Phenylalanin (F; Abb. 4.30 A). Auch hier bildet Cdc20 aus *S. cerevisiae* eine Ausnahme, da es an dieser Position ein Asparagin (N) enthält. Der Sequenzvergleich unterstützt daher die Vermutung, dass die Aminosäuren T449 und Y492 wichtige Determinanten der unterschiedlichen Spezifität von Cdc20 und Cdh1 in *S. cerevisiae* sein könnten. Außerdem könnten in *S. cerevisiae* die Unterschiede in der Substratspezifität der Aktivatoren in besonderer Weise ausgeprägt sein, da Cdc20 aus *S. cerevisiae* in diesen Positionen auch von den anderen Cdc20-Orthologen abweicht. In der Zufallsmutagenese wurden die Aminosäuren T449 und Y492 in den verschiedenen Mutanten jeweils zu unterschiedlichen Aminosäuren mutiert. Dabei handelte es sich außer im Fall der Mutante M29 nicht um die Aminosäure, die in Cdc20 natürlicherweise an der betreffenden Position vorliegt. Um die Bedeutung von T449 und Y492 für die Spezifität der Aktivatoren weiter zu untersuchen, wurden die Aminosäuren in *N20WD1* zu den äquivalenten Aminosäuren aus Cdc20 mutiert (T449Q und Y492N).

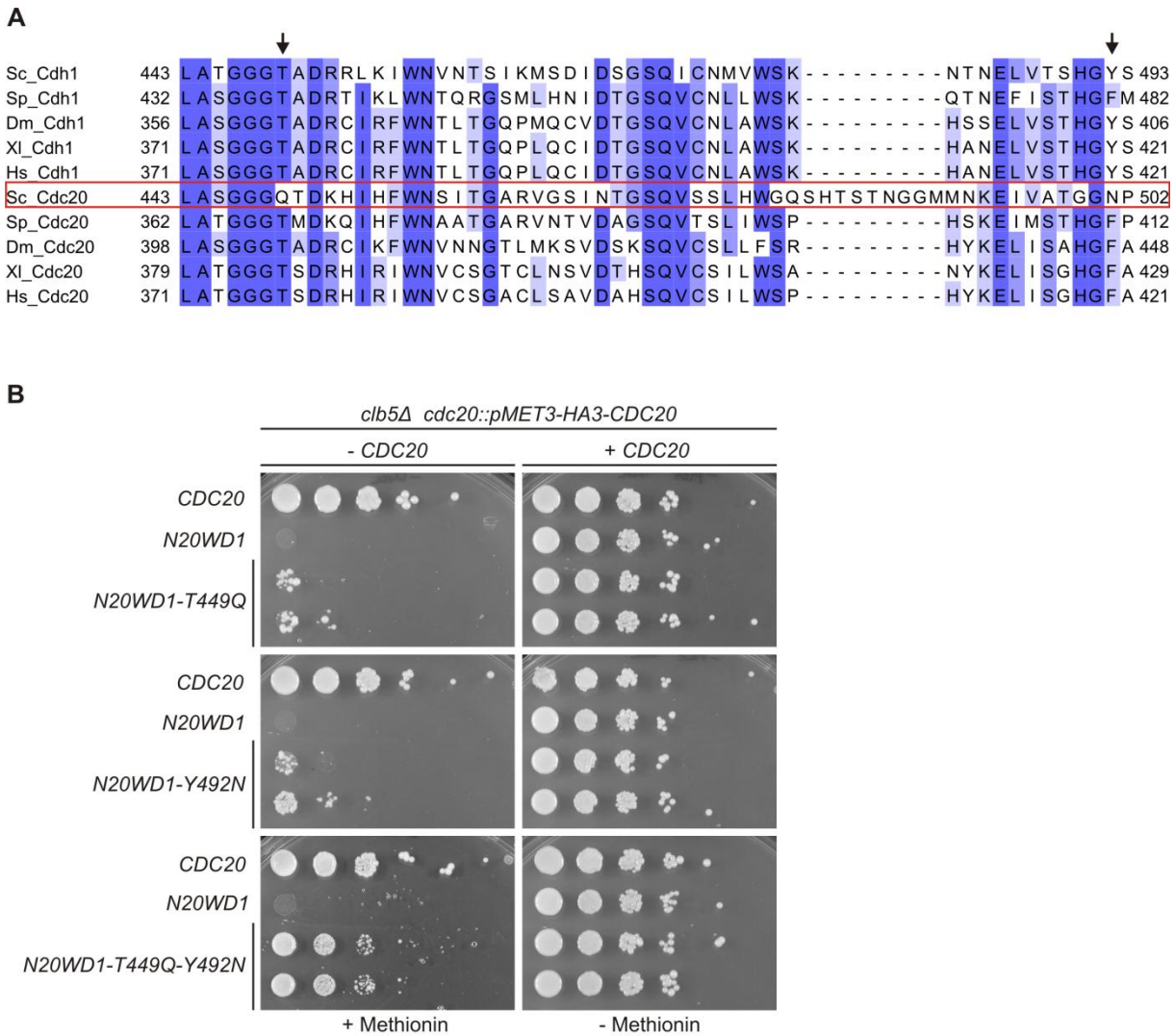


Abbildung 4.30: Rolle der Aminosäuren T449 und Y492 für die Spezifität von N20WD1

(A) Ausschnitt eines Sequenzvergleichs der WD40-Domänen von Cdc20 und Cdh1 aus verschiedenen Organismen. Die Intensität der blauen Hintergrundfarbe spiegelt den Grad der Konservierung der einzelnen Positionen wider. Der rote Rahmen hebt die Sequenz von Cdc20 aus *S. cerevisiae* hervor. Die schwarzen Pfeile oberhalb des Sequenzvergleichs markieren die durch Zufallsmutagenese und anschließendem WD40-Spezifitäts-Screen identifizierte Aminosäuren T449 und Y492 in der WD40-Domäne von Cdh1. Die Zahlen geben Aminosäurepositionen an. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Xl: *Xenopus laevis*, Hs: *Homo sapiens*. **(B)** Wachstum von *clb5Δ*-Zellen nach Abschaltung von *CDC20* und Expression von *N20WD1*-Derivaten mit Mutation der Aminosäuren T449 und Y492 zu den äquivalenten Aminosäuren in Cdc20. Ein *clb5Δ*-Stamm, in welchem die Expression des endogenen *CDC20* unter Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotors steht (*cdc20Δ::pMET3-HA3-CDC20*), wurde mit ARS/CEN-Plasmiden transformiert, die entweder *CDC20*, *N20WD1* oder die mutierten Versionen von *N20WD1* unter Kontrolle des *CDC20*-Promotors enthielten. Die resultierenden Transformanten wurden zwei Tage in Flüssigmedium ohne Methionin bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurden die Stämme in Form einer Verdünnungsreihe mit 1:10-Schritten ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml auf Selektionsplatten mit Methionin (restriktiv, keine Expression von *CDC20*) oder ohne Methionin (permissiv, *CDC20* exprimiert) getropft und 48 h bei 30°C inkubiert. Das Flüssigmedium und die Selektionsplatten enthielten kein Uracil, um einen Verlust der ARS/CEN-Plasmide zu verhindern.

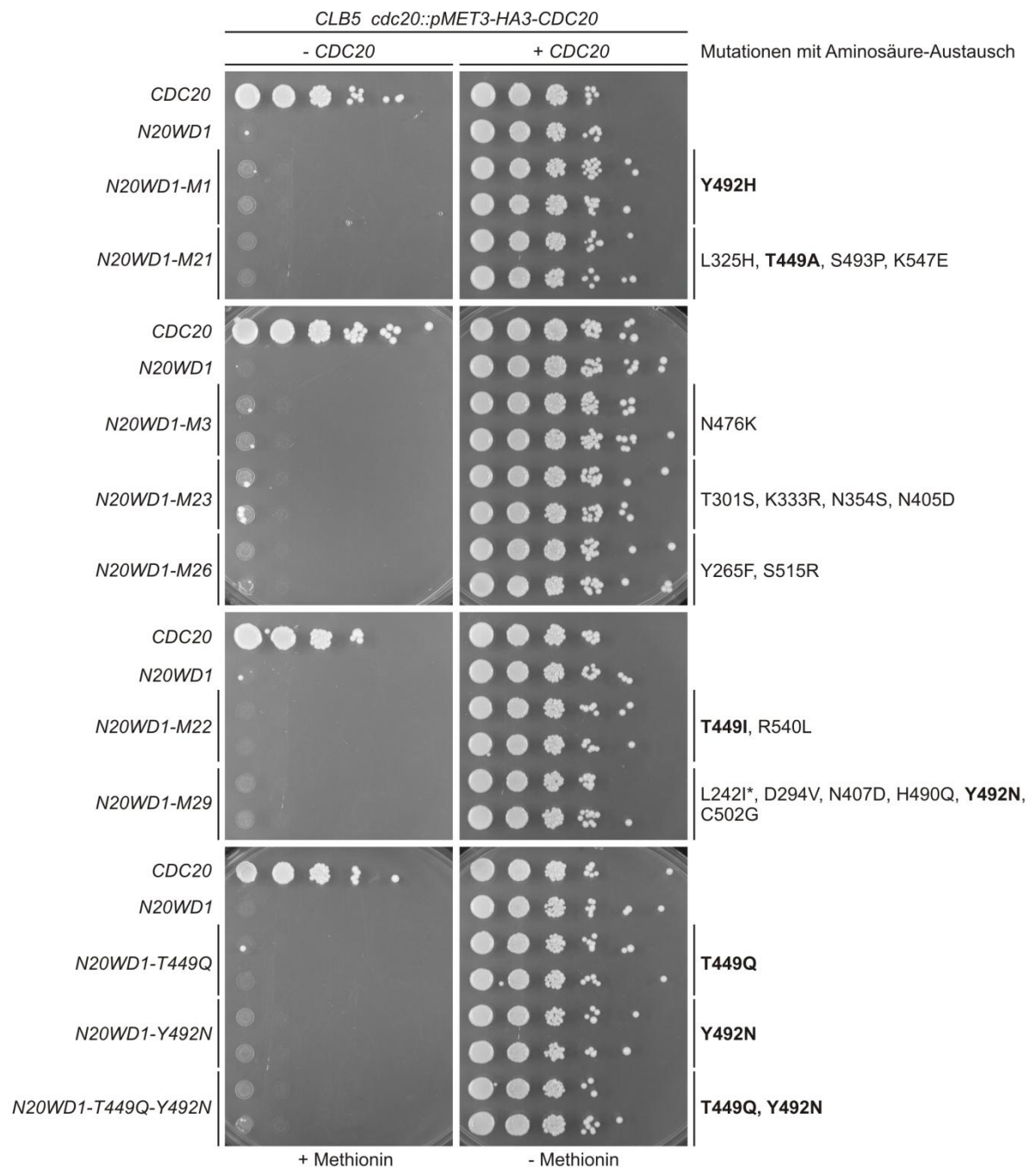


Abbildung 4.31: Übernahme der Cdc20-Funktion durch N20WD1-Mutanten bei Anwesenheit von Clb5

Wachstum von *CLB5*-Zellen nach Abschaltung von *CDC20* und Expression verschiedener *N20WD1*-Versionen mit Mutationen in der WD40-Domäne von Cdh1. Ein Stamm, in welchem die Expression des endogenen *CDC20* unter Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotors steht (*cdc20Δ::pMET3-HA3-CDC20*), wurde mit ARS/CEN-Plasmiden transformiert, die entweder *CDC20*, *N20WD1* oder die mutierten Versionen von *N20WD1* aus den Abbildung 4.29 und 4.30 B enthielten. Die resultierenden Transformanten wurden zwei Tage in Flüssigmedium ohne Methionin bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurden die Stämme in Form einer Verdünnungsreihe mit 1:10-Schritten ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml auf Selektionsplatten mit Methionin (restriktiv, keine Expression von *CDC20*) oder ohne Methionin (permissiv, *CDC20* exprimiert) getropft und 48 h bei 30°C inkubiert. Das Flüssigmedium und die Selektionsplatten enthielten kein Uracil, um einen Verlust der ARS/CEN-Plasmide zu verhindern. Auf der rechten Seite sind die Mutationen der *N20WD1*-Derivate aufgelistet, die zu einer Veränderung der Aminosäuren an den angegebenen Positionen führten. Aminosäurepositionen, die mehrfach in verschiedenen Konstrukten betroffen waren, sind fett gedruckt. Die mit einem Sternchen

versehene Mutation L242I betrifft eine Aminosäureposition in der von Cdc20 stammenden, N-terminalen Domäne.

Während die Mutationen einzeln nur ein minimales Wachstum in Abwesenheit von Cdc20 ermöglichten, verbesserte ihre Kombination die Zellproliferation deutlich (Abb. 4.30 B). Dass der simultane Austausch von T449 und Y492 hinreichend für moderates Wachstum in Abwesenheit von Cdc20 war, unterstreicht die Spezifität-bestimmende Funktion der beiden Aminosäuren. Allerdings zeigten die Zellen der T449Q-Y492N-Mutante ein schlechteres Wachstum als Zellen, die das *CDC20*-Kontrollkonstrukt exprimierten. Daher scheinen neben T449 und Y492 noch weitere Aminosäuren zur unterschiedlichen Spezifität der WD40-Domänen von Cdc20 und Cdh1 beizutragen.

Durch die Deletion von *CLB5* in dem Screening-Stamm wurden die Mutationen in N20WD1, die ein Wachstum in Abwesenheit von Cdc20 ermöglichten, unter Bedingungen identifiziert, die keine Degradation von Clb5 erforderten. Um zu überprüfen, ob die N20WD1-Mutanten die Funktion von Cdc20 auch in Anwesenheit von Clb5 übernehmen können, wurden die N20WD1-Konstrukte in einen Stamm mit abschaltbarem *CDC20* (*pMET3-CDC20*) eingebracht, in welchem das *CLB5*-Gen anders als im zuvor verwendeten Screening-Stamm intakt war. Im Gegensatz zu dem *CDC20*-Plasmid konnten die N20WD1-Konstrukte kein Wachstum nach Abschalten des endogenen *CDC20* vermitteln, wenn Clb5 degradiert werden musste (Abb. 4.31). Daraus wird ersichtlich, dass die identifizierten Mutationen der Chimäre N20WD1 keine allgemeine Cdc20-Funktion verleihen, sondern speziell die Erkennung von Pds1 betreffen.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die unterschiedliche Substratspezifität von Cdc20 und Cdh1 auf Unterschieden in den WD40-Domänen basiert. Mittels Zufallsmutagenese konnten Bereiche in den WD40-Domänen identifiziert werden, welche für die selektive Bindung von Pds1 an Cdc20 ursächlich sind und dadurch zu der Ausprägung der unterschiedlichen Substratspezifität der Aktivatoren beitragen.

5 DISKUSSION

Der APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) kontrolliert den Ablauf kritischer Prozesse im eukaryotischen Zellteilungszyklus wie die Trennung der Schwesterchromatiden oder den Austritt aus der Mitose durch die Ubiquitinierung regulatorischer Proteine, die dadurch für den Abbau durch das Proteasom markiert werden (Peters, 2006; Sivakumar und Gorbsky, 2015). Die Ubiquitinierung der Substrate beruht auf den Aktivatorproteinen Cdc20 und Cdh1, die den APC/C in verschiedenen Phasen des Zellzyklus aktivieren und zur Bindung der Substrate beitragen. Neben der unterschiedlichen Substratspezifität ist vor allem die Zellzyklus-regulierte Bindung der Aktivatoren an den APC/C für die geordnete Degradation der APC/C-Substrate essentiell. Daher unterliegen die Aktivatoren einer komplexen Regulation, die deren Interaktion mit dem APC/C strikt kontrolliert. In dieser Arbeit konnten neue Einblicke in die Mechanismen gewonnen werden, die der Regulation von Cdh1 durch Phosphorylierung, der Regulation von Cdc20 durch Cdh1-vermittelte Proteolyse, der Aktivierung des APC/C durch Cdc20 und der unterschiedlichen Substratspezifität der Aktivatoren zu Grunde liegen.

5.1 Separate Cdk-Phosphorylierungsstellen steuern die Lokalisation und APC/C-Bindung von Cdh1

In der Regulation von Cdh1 ist die Phosphorylierung durch Cdk's ein konservierter Mechanismus, der die Bindung des Aktivators an den APC/C verhindert und die Aktivität von APC/C-Cdh1 auf den Zeitraum von der späten Mitose bis zum Ende der G1-Phase begrenzt, in welchem die Cdk-Aktivität niedrig ist (Zachariae *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999; Lukas *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2001). Die NTD von Cdh1 aus *S. cerevisiae* besitzt 9 Cdk-Konsensussequenzen und für acht dieser Positionen konnte die Phosphorylierung *in vivo* bestätigt werden (Hall *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2009; Swaney *et al.*, 2013). Lediglich die Phosphorylierung an dem zweiten Cdk-Motiv (Serin 16) konnte nicht mit absoluter Gewissheit nachgewiesen werden (Hall *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde in einer früheren Arbeit gezeigt, dass alle neun Cdk-Motive zur Inaktivierung von Cdh1 beitragen (Zachariae *et al.*, 1998). In *S. cerevisiae* beeinflusst die Phosphorylierung durch Cdk1 neben der APC/C-Bindung auch die Lokalisation von Cdh1 (Jaquenoud *et al.*, 2002). Der genaue Wirkmechanismus der Phosphorylierung blieb dabei ebenso unklar wie der Grund für das

Vorhandensein multipler Phosphorylierungsstellen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Cdk-Motive in Cdh1 in zwei Gruppen unterteilen lassen, welche die Aktivität von Cdh1 auf unterschiedliche Weise steuern. Während die Cdk-Motive 1-3 die Lokalisation des Aktivators im Zellkern regulieren, kontrollieren die übrigen sechs Phosphorylierungsstellen die Bindung von Cdh1 an den APC/C. Beide Mechanismen scheinen für die Regulation von Cdh1 von Bedeutung zu sein, da die Inaktivierung eines der beiden Regulationsmechanismen bereits bei niedriger Expression von *CDH1* Wachstumsdefekte hervorruft (Abb. 8.2 B im Anhang). Dadurch grenzt sich Cdh1 von anderen Cdk-Substraten ab, deren Phosphorylierung an multiplen Positionen in einer einzelnen, molekularen Wirkung mündet (Deshaies und Ferrell, 2001; Ferrell und Ha, 2014).

5.1.1 Die Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 kontrollieren die Lokalisation von Cdh1 im Zellkern

Während der APC/C in allen Zellzyklusphasen im Zellkern detektiert wurde (Abb. 8.3 im Anhang; Zachariae *et al.*, 1996; Jaquenoud *et al.*, 2002; Melloy und Holloway, 2004), befindet sich Cdh1 nur in bestimmten Zellzyklusphasen im Zellkern (Abb. 4.1; Jaquenoud *et al.*, 2002). In der S-Phase und frühen Mitose ist Cdh1 zytoplasmatisch, akkumuliert in der Anaphase im Zellkern und re-lokalisiert am Ende der G1-Phase wieder im Zytoplasma. In dieser Arbeit wurde die NTD als verantwortliche Region für die Zellzyklus-regulierte Lokalisation von Cdh1 im Zellkern identifiziert (Abb. 4.1 und 4.2) und mit Hilfe von verkürzten und mutierten Versionen der NTD wurde die molekulare Grundlage für den regulierten Kerntransport des Aktivators untersucht. Interessanterweise sind für die Regulation der Kernlokalisation von Cdh1 nur die Cdk-Motive 1-3 verantwortlich, während die übrigen sechs Cdk-Phosphorylierungsstellen keinen Einfluss auf die Lokalisation des Aktivators haben (Abb. 4.5 – 4.7). Die Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 befinden sich im Bereich einer vorhergesagten, bipartiten NLS (Abb. 5.1; Kosugi *et al.*, 2009), die im Rahmen dieser Arbeit als funktionelle und für die Kernlokalisation von Cdh1 notwendige NLS bestätigt wurde (Abb. 4.4). Folgende Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Kernimportfunktion der NLS reguliert ist und durch die Phosphorylierung der Cdk-Motive 1-3 inhibiert wird: Zum einen akkumulierte das Konstrukt Cdh1(1-100)-GFP während der Anaphase im Zellkern, wurde aber zum Ende der G1-Phase nur sehr ineffizient aus dem Zellkern transportiert (Abb. 4.3). Auf Grund des beeinträchtigten Kernexports ist ein



Die Cdk-Phosphorylierungsstellen (grau), die NLS (oliv) und die C-Box (blau) sind farbig hervorgehoben. Die Phosphat-akzeptierenden Aminosäuren der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind zusätzlich mit nummerierten Pins markiert. Aminosäurereste, die nachweislich *in vivo* phosphoryliert werden (Hall *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2009; Swaney *et al.*, 2013), sind als rote Buchstaben gekennzeichnet. Die grauen Zahlen geben die Aminosäurepositionen an. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

125

2008). Allerdings befinden sich die bislang für Cdc5 nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen nicht innerhalb der NLS-Region von Cdh1 (Crasta *et al.*, 2008), die darüber hinaus auch keine Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch Cdc5 enthält (Nakajima *et al.*, 2003). Somit muss in künftigen Studien geklärt werden, ob Cdc5 an der Inaktivierung der NLS tatsächlich beteiligt ist. Alternativ könnte Cdk1 selbst für die Phosphorylierung der Serinreste 21 und 23 verantwortlich sein. Zumindest konnte für den Cdk-Inhibitor Sic1 berichtet werden, dass Cdk1 mit Hilfe seiner akzessorischen Untereinheit Cks1 an ein zuvor selbst phosphoryliertes Cdk-Motiv binden kann, um einen benachbarten Serinrest, der nicht Bestandteil einer Cdk-Konsensussequenz ist, zu phosphorylieren (Koivomagi *et al.*, 2011a). Auch wenn die umliegenden Aminosäuren nicht vollständig der ermittelten Sequenz für die Bindung von Cks1 entsprechen (McGrath *et al.*, 2013), könnte das phosphorylierte Threonin des ersten Cdk-Motivs als *docking site* für eine solche Cks1-vermittelte Phosphorylierung des Serinrests 21 oder 23 durch Cdk1 dienen, zumal sich diese Positionen innerhalb der dafür optimalen Reichweite von 12 bis 16 Aminosäuren befinden (Koivomagi *et al.*, 2013). Übereinstimmend mit der möglichen Funktion der Cdk-Motive 1-3 als *docking sites* für die Phosphorylierung benachbarter Positionen führte ihre Mutation durch Alanin-Substitutionen zu einer beträchtlichen Abnahme der hyperphosphorylierten Formen von Cdh1 in der Westernblot-Analyse (Abb. 4.8 – 4.10). Für die Bindung von Cks1 ist das Vorhandensein eines phosphorylierten Threoninrests essentiell, welcher weder durch eine phosphorylierte Serin-Seitenkette noch durch eine Phosphat-imitierende Aminosäure ersetzt werden kann (McGrath *et al.*, 2013). Somit könnte die mögliche Rolle der Cdk-Motive 1-3 als Phospho-Bindestellen zusätzlich erklären, warum der Austausch der Phosphat-akzeptierenden Aminosäuren durch Aspartat keine vollständige Abschaltung der NLS bewirkte (Abb. 4.6 C). In dieser Annahme konnten die negativ geladenen Seitenketten der Aspartate in den mutierten Cdk-Motiven zwar den Kernimport von Cdh1(1-257)-GFP beeinträchtigen und eine partielle Lokalisation im Zytoplasma hervorrufen (Abb. 4.6 C), unterstützten aber nicht die Phosphorylierung weiterer Positionen im Bereich der NLS, welche für eine maximale Inaktivierung des Kernimports notwendig sein könnte.

Neben einem Zellzyklus-regulierten Import in den Zellkern konnten in dieser Arbeit auch Hinweise auf einen aktiven Kernexport von Cdh1 am Ende der G1-Phase gefunden werden, da die Abnahme des Kernsignals von Cdh1(1-257)-GFP mit einer Zunahme des GFP-Signals im Zytoplasma einherging (Abb. 4.2). In einer früheren Studie wurde Msn5 als möglicher

Exportfaktor für den Transport von Cdh1 aus dem Zellkern in das Zytoplasma identifiziert (Jaquenoud *et al.*, 2002). Allerdings konnte bislang noch keine Konsensussequenz für den Msn5-abhängigen Kernexport bestimmt werden, wie sie im Fall des Exportins Crm1 existiert (Kutay und Guttinger, 2005). Die Konsensussequenz einer durch Crm1 erkannten NES ist ein Leucin-reiches Motiv (la Cour *et al.*, 2004; Kosugi *et al.*, 2008), in welchem Leucine oder andere hydrophobe Aminosäuren einem helikalen Muster entsprechend in einem festen Abstand zueinander angeordnet sind. Strukturanalysen eines Komplexes aus Crm1 und einem Zielprotein zeigen, dass die Helix einer solchen NES in einer hydrophoben Furche von Crm1 bindet (Dong *et al.*, 2009; Monecke *et al.*, 2009). Cdh1 enthält ein Motiv zwischen den Aminosäuren 64-72, das eine geringe Ähnlichkeit zu dem helikalen Muster einer NES für Crm1-abhängigen Export aufweist (Abb. 8.15). Allerdings wurde der regulierte Kerntransport von Cdh1(1-257)-GFP nicht durch die Mutation dieses Motivs beeinträchtigt (Abb. 8.15), sodass ein Beitrag dieser Sequenz zu dem Kernexport von Cdh1 unwahrscheinlich ist.

Im Fall von Cdh1 wurde ursprünglich ein unmittelbar am N-Terminus gelegener Bereich als Region für die Msn5-Bindung ermittelt (Jaquenoud *et al.*, 2002). In dieser Arbeit deutet die Analyse der verkürzten NTD-Konstrukte darauf hin, dass Sequenzen zwischen den Aminosäuren 100-257 ebenfalls notwendig für einen effizienten Export von Cdh1 aus dem Zellkern sind (Abb. 4.3). Dies lässt vermuten, dass die Sequenzen, die zu der Bindung von Msn5 beitragen, über die NTD von Cdh1 verteilt liegen. Tatsächlich umfassen die Regionen, die in anderen Proteinen für die Wechselwirkung mit Msn5 kartiert wurden, 100 und mehr Aminosäuren (DeVit und Johnston, 1999; Boustany und Cyert, 2002; Ueta *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2016). Diese Regionen weisen jedoch keine auffallenden Sequenzähnlichkeiten zueinander oder zu Cdh1 auf. Möglicherweise erkennt Msn5 seine Substrate über eine spezielle Konformation, der kein einfaches lineares Motiv zu Grunde liegt und für deren Ausbildung ein größerer Sequenzbereich erforderlich ist. Für die Aufklärung eines derartigen Erkennungssignals wären Strukturdaten von zentraler Bedeutung.

Interessanterweise deuten die Ergebnisse dieser Arbeit an, dass die Sequenzen für Kernimport und -export in Cdh1 überlappen könnten. So lassen folgende Daten vermuten, dass die identifizierte NLS-Region nicht nur für den Kernimport von Cdh1(1-257)-GFP benötigt wird (Abb. 4.4), sondern auch für den Export des Konstrukts notwendig ist (Abb. 8.16 im Anhang): Das Unvermögen der NLS-Mutante, während der Anaphase im Zellkern zu lokalisieren (Abb. 8.16 B im Anhang), ließ sich mit Hilfe einer heterologen, konstitutiv aktiven

NLS korrigieren (Abb. 8.16 C im Anhang). Das resultierende Konstrukt Cdh1(1-257)-NLSm-GFP+NLS wies auch in allen übrigen Zellzyklusphasen ein deutliches Signal im Zellkern auf (Abb. 8.16 C im Anhang). Dies steht im Einklang mit der Vorstellung, dass die Zellzyklus-abhängige Lokalisation von Cdh1 im Zellkern auf der Regulation der NLS-Aktivität durch die Cdk-Motive 1-3 beruht. Weiterhin lässt sich daraus schließen, dass die Phosphorylierungsstellen 1-3 nur den Import der nativen NLS in Cdh1 inhibieren können, sich aber nicht auf die Funktion einer heterologen NLS an anderer Position des Proteins auswirken. Im Gegensatz dazu zeigte ein analoges Konstrukt mit intakter NLS, welches durch die Fusion der heterologen NLS an das Wildtyp-Konstrukt Cdh1(1-257)-GFP entstanden war, eine regulierte Kernlokalisation, wie sie für das ursprüngliche NTD-Konstrukt beobachtet worden ist (Abb. 8.16 A und D im Anhang). Daraus lässt sich schließen, dass die Mutation der NLS-Sequenz nicht nur den Kernimport, sondern auch den Kernexport von Cdh1(1-257)-GFP verhindert. Zudem scheint der native Export von Cdh1(1-257)-GFP+NLS stärker als der Import durch die heterologe NLS zu sein, sobald die native NLS durch Phosphorylierung inhibiert ist. Zusammengefasst deuten diese Daten an, dass dieselben Aminosäuren, die für die Bindung von Cdh1 an das Importin benötigt werden, auch für die Ausbildung der strukturellen NES für den Export des Proteins aus dem Zellkern notwendig sind. Dies deckt sich mit den früheren Beobachtungen, dass die N-terminalen 50 Aminosäuren nicht nur für den Kernimport, sondern auch für eine robuste Interaktion mit dem Exportin Msn5 benötigt werden (Jaquenoud *et al.*, 2002). Somit könnte Cdh1 ein kombiniertes NLS/NES-Element besitzen, dessen Kernimportfunktion durch Phosphorylierung im Zellzyklus reguliert ist. Dabei ist fraglich, ob die Phosphorylierung zusätzlich den Kernexport durch Msn5 fördert. In verschiedenen Fällen waren intakte Phosphorylierungsstellen für den Msn5-vermittelten Export von Proteinen in das Zytoplasma notwendig (Kaffman *et al.*, 1998; DeVit und Johnston, 1999; Boustany und Cyert, 2002; Ueta *et al.*, 2007; Taberner *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 2009). Daher wurde angenommen, dass Msn5 seine Substrate bevorzugt im phosphorylierten Zustand bindet und der Export dadurch regulierbar ist. Zumindest für den Transkriptionsfaktor Pho4 konnte gezeigt werden, dass dessen Interaktion mit Msn5 Phosphorylierungs-abhängig ist (Kaffman *et al.*, 1998). Allerdings verbesserte die Phosphorylierung von Cdh1 nicht dessen Bindung an Msn5 (Jaquenoud *et al.*, 2002). Dies spricht dafür, dass Cdh1 unabhängig seines Phosphorylierungszustands durch Msn5 erkannt und aus dem Zellkern transportiert wird und dass die Phosphorylierung lediglich den

entgegenwirkenden Kernimport steuert. In der Tat wäre ein konstitutiver Export in Kombination mit einem durch Cdk-regulierten, starken Kernimport in der späten Mitose und G1-Phase ausreichend, um die Zellzyklus-regulierte Kernlokalisierung von Cdh1 zu erklären. Interessanterweise wird die Kernlokalisierung des Cdh1-Inhibitors Acml ebenfalls durch Cdk1-Phosphorylierung negativ reguliert und wie Cdh1 verlässt Acml den Zellkern am G1/S-Übergang und ist bis zur späten Mitose zytoplasmatisch (Enquist-Newman *et al.*, 2008). Somit wäre es denkbar, dass Acml die Phosphorylierungs-abhängige Lokalisation von Cdh1 im Zytoplasma unterstützt, zumal Cdh1 indirekt über Acml an das 14-3-3-Protein Bmh1 bindet (Martinez *et al.*, 2006; Dial *et al.*, 2007) und 14-3-3-Proteine die Lokalisation von Proteinen beeinflussen können (Muslin und Xing, 2000). Folgende Beobachtungen sprechen jedoch gegen diese Möglichkeit: Zum einen interagieren Acml und Cdh1 Phosphorylierungs-unabhängig miteinander (Dial *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2008). Darüber hinaus bindet Acml nicht an die NTD von Cdh1, sondern interagiert ausschließlich mit dessen CTD (Choi *et al.*, 2008; He *et al.*, 2013), die keinen Beitrag zur regulierten Kernlokalisierung leistet (Abb. 4.1). Zum anderen zeigt Cdh1 auch in Abwesenheit von Acml weiterhin die normale, Zellzyklus-abhängige Lokalisation im Zellkern und Zytoplasma (Martinez *et al.*, 2006). Somit spielt Acml für die regulierte Kernlokalisierung von Cdh1 keine Rolle. Allerdings beeinflusst Acml die Lokalisation von Cdh1 am Knospenhals und diese Funktion scheint wichtig für die Spindelmorphologie und Positionierung des Zellkerns zu sein (Martinez *et al.*, 2012).

5.1.2 Die Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9 kontrollieren die Bindung von Cdh1 an den APC/C

Die Blockierung des Kernimports von Cdh1 durch Phosphorylierung der Cdk-Motive 1-3 führt zu einer räumlichen Trennung von Cdh1 und dem APC/C, dessen wesentlicher Anteil sich in *S. cerevisiae* im Zellkern befindet (Abb. 8.3 im Anhang, Zachariae *et al.*, 1996; Jaquenoud *et al.*, 2002; Melloy und Holloway, 2004), und kann daher als wichtiger Beitrag zu der Inaktivierung von APC/C-Cdh1 angesehen werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Cdh1 an den Cdk-Konsensussequenzen 4-9 zusätzlich die Bindung von Cdh1 an den APC/C verhindert und als unabhängiger Mechanismus die Aktivität von APC/C-Cdh1 reguliert. Die Cdk-Motive 4-9 lassen sich auf Grund ihrer Verteilung in der NTD in zwei Subgruppen unterteilen und die Phosphorylierung jeder Subgruppe beeinflusst die Interaktion von Cdh1 mit dem APC/C (Abb. 4.8 B und 4.9 B).

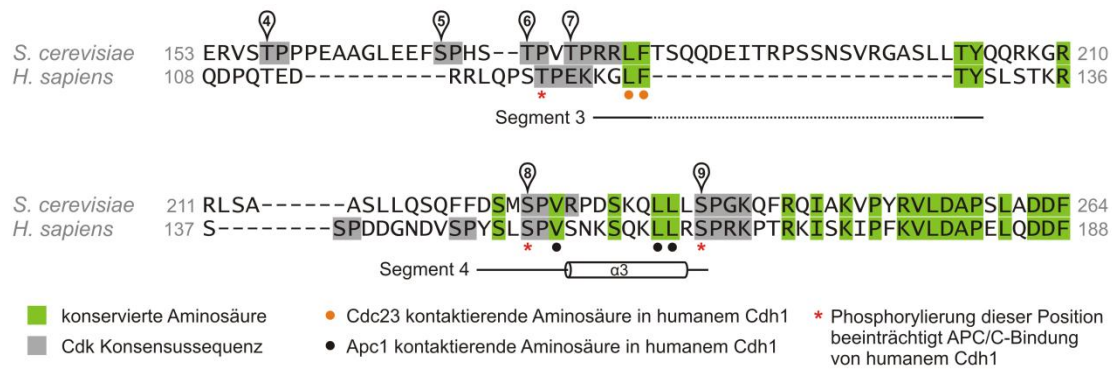


Abbildung 5.2: Regulation von APC/C-Interaktionsmotiven in Cdh1 durch Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9

Sequenzvergleich von APC/C-Interaktionsmotiven und benachbarten Cdk-Phosphorylierungsstellen der Cdh1-Orthologen aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens*. Identische Aminosäuren (grün) und die Cdk-Phosphorylierungsstellen (grau) sind farbig hervorgehoben. Die Phosphat-akzeptierenden Aminosäuren der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind mit nummerierten Pins markiert. Die orangenen und schwarzen Punkte kennzeichnen Aminosäuren in humanem Cdh1, welche die APC/C-Untereinheiten Cdc23 und Apc1 kontaktieren (Chang *et al.*, 2015). Die roten Sternchen markieren Cdk-Phosphorylierungsstellen in humanem Cdh1, deren Phosphorylierung die Interaktion mit dem APC/C verhindert (Chang *et al.*, 2015). Strukturierte Segmente gemäß Chang *et al.* 2015 sind durch Linien und Helices gekennzeichnet. Die grauen Zahlen geben Aminosäurepositionen an. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

Die Häufung der Cdk-Motive in zwei bestimmten Regionen von Cdh1 lassen vermuten, dass die zwei Subgruppen von Phosphorylierungsstellen unterschiedliche APC/C-Bindemotive in Cdh1 regulieren. Diese Idee wird durch eine kürzlich veröffentlichte Atomstruktur des humanen APC/C-Cdh1 in einem Komplex mit seinem Inhibitor Emi1 gestützt (Chang *et al.*, 2015). Laut dieser Struktur geht die NTD von Cdh1 multiple Kontakte mit mehreren APC/C-Untereinheiten ein. So binden die C-Box und ein konserviertes LF-Motiv von Cdh1 an Apc8/Cdc23, während zwei α -Helices die PC-Domäne der Untereinheit Apc1 mit Hilfe von konservierten, hydrophoben Aminosäuren kontaktieren. Zu diesen hydrophoben Aminosäuren zählen die Leucinreste eines KLLR-Motivs, das in seiner Sequenz dem in humanem Cdc20 identifizierten KILR-Motiv ähnelt (Zhang und Lees, 2001; Izawa und Pines, 2012). Allerdings scheinen die Motive in Cdc20 und Cdh1 an unterschiedliche APC/C-Untereinheiten zu binden (Chang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Zusätzlich zur Generierung der Atomstruktur wurde mit Hilfe eines *in-vitro*-Ubiquitinierungsexperiments gezeigt, dass nur vier der neun Cdk-Phosphorylierungsstellen in humanem Cdh1 für die negative Regulation der APC/C-Cdh1-Aktivität notwendig sind (Chang *et al.*, 2015). Gemäß der Atomstruktur befinden sich zwei dieser Phosphorylierungsstellen (Serin 40 und Theronin 121) in dem Bereich von Cdh1, der an Apc8/Cdc23 grenzt, während die anderen beiden Phosphorylierungsstellen (die Serine 151 und 163) das KLLR-Motiv flankieren, das mit Apc1

interagiert. Sowohl die hydrophoben Aminosäuren des KLLR-Motivs als auch die benachbarten Cdk-Konsensussequenzen, die in Cdh1 aus *S. cerevisiae* den Cdk-Motiven 8 und 9 entsprechen, sind bezüglich ihrer relativen Position in den Cdh1-Orthologen aus *S. cerevisiae* und dem Menschen konserviert (Abb. 5.2). Die Cdk-Motive 4-7 von Cdh1 aus *S. cerevisiae* sind in ihrer Anzahl und Position weniger konserviert, befinden sich jedoch in der Nähe des LF-Motivs, das in der Struktur des humanen APC/C mit Apc8/Cdc23 interagiert (Abb. 5.2; Chang *et al.*, 2015). Der Sequenzvergleich mit humanem Cdh1 legt zudem nahe, dass diese Phosphorylierungsstellen äquivalent zu dem Cdk-Motiv um Threonin 121 des humanen Proteins sind (Abb. 5.2). Somit scheinen sowohl die APC/C-Bindestellen als auch ihre Regulation durch Cdk-Phosphorylierung zwischen den Cdh1-Orthologen konserviert zu sein.

Die Mutation der Cdk-Motive 1-9 in Cdh1 war hinreichend, um auch bei hoher Cdk1-Aktivität, die durch Co-Expression eines stabilen Clb2-Derivats erzielt wurde, eine robuste Interaktion mit dem APC/C zu ermöglichen (Abb. 4.9). Daraus lässt sich schließen, dass die Interaktion von Cdh1 mit dem APC/C allein durch die Phosphorylierung von Cdh1 reguliert ist und nicht durch die Phosphorylierung von APC/C-Untereinheiten beeinflusst ist. Tatsächlich zeigen aktuelle Literaturdaten, dass Cdh1 sowohl phosphorylierten als auch nicht-phosphorylierten APC/C binden und aktivieren kann, wobei die Phosphorylierung des APC/C die Cdh1-Bindung fördert (Qiao *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Interessanterweise überlappt die NLS des humanen Cdh1-Orthologs, anders als im Fall von Cdh1 aus *S. cerevisiae*, mit dem KLLR-Motiv, das mit der APC/C-Untereinheit Apc1 interagiert (Zhou *et al.*, 2003a; Zhou *et al.*, 2003b; Chang *et al.*, 2015). Darüber hinaus wird die Kernimportfunktion der NLS in humanem Cdh1 durch dieselben Cdk-Phosphorylierungsstellen reguliert (Zhou *et al.*, 2003a), deren Phosphorylierung auch die Bindung und Aktivierung des APC/C *in vitro* verhindert (Lukas *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2015). Dies scheint in Cdh1 aus *S. cerevisiae* nicht realisiert zu sein, da der Bereich zwischen den Aminosäuren 145-257, der das KLLR-Motiv mit einschließt, keine NLS-Aktivität aufwies (Abb. 4.3) und keines der Cdk-Motive in diesem Segment Einfluss auf die Zellzyklus-regulierte Kernlokalisierung von Cdh1(1-257)-GFP ausübte (Abb. 4.5-4.7). Umgekehrt stellt sich die Frage, ob die Cdk-Motive 1-3 neben ihrer regulatorischen Funktion für die Kernlokalisierung auch einen Beitrag zur Kontrolle der APC/C-Bindung leisten. Vor allem für die dritte Cdk-Phosphorylierungsstelle, die sich in der Nähe zur C-Box befindet (Abb. 5.1),

kann eine solch duale Funktion nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dieser Umstand ist nicht ohne Weiteres zu klären, da die Mutation der Cdk-Motive 1-3 die Konzentration von Cdh1 im Zellkern erhöht und dadurch die Bindung an den APC/C bereits begünstigen sollte. Eine Möglichkeit bestünde darin, Cdh1 mit Hilfe einer heterologen NLS konstitutiv im Zellkern zu lokalisieren und die Auswirkung der m(1-3)A-Mutation auf die APC/C-Bindung an Hand dieses Konstrukts zu testen. Während sich die Lokalisation von Cdh1 auf die Wechselwirkung mit dem APC/C auswirkt, scheint dies in umgekehrter Richtung nicht zwingend der Fall zu sein. Zumindest beeinflusste die Mutation der C-Box als APC/C-Bindemotiv weder den regulierten Kerntransport von Cdh1(1-257)-GFP noch die konstitutive Kernlokalisierung von Cdh1(1-257)-m(1-9)A-GFP (Abb. 8.17 im Anhang). Daher scheinen in *S. cerevisiae* die Regulation des Kernimports durch die Cdk-Phosphorylierungsstellen 1-3 und die Regulation der APC/C-Bindung durch Phosphorylierung der Cdk-Motive 4-9 zwei unabhängige Mechanismen zu sein, die beide für die Inaktivierung von Cdh1 notwendig sind.

5.2 Eine D-Box und eine NLS sind essentielle Bestandteile des Cdc20-Degrans für Cdh1-abhängige Degradation

Der Cdh1-vermittelte Abbau von Cdc20 ist ein wichtiger und konservierter Schritt in der Inaktivierung von APC/C-Cdc20 am Ende der Mitose (Prinz *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998; Pfleger und Kirschner, 2000; Robbins und Cross, 2010a). Die APC/C-Cdh1-abhängige Degradation von Cdc20 in *S. cerevisiae* beruht auf zwei RxxL-Motiven, die der minimalen Konsensussequenz einer D-Box entsprechen (Glutzer *et al.*, 1991) und deren individueller Beitrag bislang nicht eindeutig geklärt war (Prinz *et al.*, 1998; Robbins und Cross, 2010a). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die N-terminalen 80 Aminosäuren von Cdc20, welche die beiden RxxL-Motive beinhalten, als minimale Abbausequenz (Degron) für die Cdh1-vermittelte Instabilität identifiziert (Abb. 4.11 – 4-13). Bei der Kartierung des Cdc20-Degrans stellte sich heraus, dass das erste RxxL-Motiv (RxxL1) Teil einer funktionellen D-Box ist, die sowohl hinreichend als auch notwendig für die Degradation von Cdc20(1-80) in der G1-Phase war (Abb. 4.14). Das RxxL2-Motiv fungierte hingegen nicht als Abbausignal, sondern unterstützte die Degradation als notwendiger Bestandteil einer NLS (Abb. 4.14 und 4.15). Die D-Box und die NLS ließen sich funktionell voneinander trennen, dennoch waren beide Elemente für die Cdh1-vermittelte Degradation erforderlich. Daraus lässt sich schließen, dass

erstens eine einzelne D-Box hinreichend für eine rasche, Cdh1-vermittelte Degradation ist und zweitens sich die D-Box für die Erkennung durch APC/C-Cdh1 im Zellkern befinden muss. Der Verlust der NLS nach C-terminaler Verkürzung des Cdc20-Degrans ließ sich für Cdc20(1-50)-GFP bezüglich Instabilität und Kernlokalisierung des Konstrukts durch die Fusion an eine heterologe NLS kompensieren (Abb. 4.15). Die NLS-Fusion konnte jedoch im Fall von Cdc20(1-40)-GFP lediglich die Lokalisation des Konstrukts im Zellkern, aber nicht die Instabilität wiederherstellen. Somit scheint der Bereich zwischen den Aminosäuren 40-50 notwendig für den Abbau des Cdc20-Degrans zu sein. Interessanterweise enthält dieser kurze Sequenzabschnitt drei Lysine (Abb. 5.3), die sich in einem geeigneten Abstand zur D-Box für den APC/C-vermittelten Transfer des Ubiquitins von einem E2-Konjugat befinden (Chang *et al.*, 2015). Somit könnte es sich bei diesen Lysinen um die kritischen Akzeptorstellen für die Ubiquitinierung durch APC/C-Cdh1 handeln.

Cdc20-Degron

1 MPESSRDKGNAAISGN **RSVL** ^{RxxL1*} SIASPTKLNILSSDWSRNQGVSKNSLKRSSSLNIRNSK ^{RxxL2} **RPSL** QASANSIYSRPKITIGA 80

Cdc5-Degron

1 MSLGPLKAINDKQLNTR **RSKL** ^{RxxL1*} VHTPIKGNTADLVG **KEN** ^{KEN} HFQTKRLDPNNDHHHPAQKKK ^{RxxL2} **REKL** SALCKTPPSLIKTRGK 80

Cin8-Degron

956 960 970 **KEN** ^{KEN} ATKDEMIENILKEIPNLS KKMPLRLS ^{Element 2} NNNSNSVQSVISPKKHAIEDENKSSENVDS ^{RxxL5} **RKMLKIE** 1030

Acm1-CIR

59 ^{ABBA-Motiv} **FMLYEETAE** ERNIAVHRHNEIYNNNSVSNENNPSQV **KEN** ^{KEN} LSPAKICPYERAFLREGG ^{DB3*} **RIAL** KDLSVD 128

Abbildung 5.3: Vergleich der Degron-Elemente von Cdh1-Substraten und der CIR von Acm1

Aminosäuresequenz der Degron-Elemente für Cdh1-vermittelte Degradation, welche in den Substraten Cdc20 (diese Arbeit), Cdc5 (Arnold *et al.*, 2015) und Cin8 (Hildebrandt und Hoyt, 2001) kartiert wurden, und der CIR (*central inhibitory region*) des Inhibitors Acm1. Die RxxL- (orange) und KEN-Motive (grün), das in Cin8 identifizierte Abbausignal Element 2 (grau; Hildebrandt und Hoyt, 2001) und das ABBA-Motiv von Acm1 (blau, He *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014; Di Fiore *et al.*, 2015) sind farbig hervorgehoben. Im ABBA-Motiv von Acm1 ist das ursprünglich identifizierte A-Motiv durch weiße Buchstaben gekennzeichnet. RxxL-Motive, die funktionelle D-Boxen darstellen, sind mit einem Sternchen versehen. Die unterstrichenen Segmente sind im Fall von Cdc20(1-80) und Cdc5(1-80) hinreichend und notwendig für die Kernlokalisierung der Degron-Konstrukte. Im Fall des Cin8-Degrans ist der unterstrichene Sequenzabschnitt notwendig für die Lokalisation im Zellkern. Die Zahlen geben Aminosäurepositionen an und richten sich im Fall von Cin8 nach den Angaben von Hildebrandt und Hoyt, 2001.

Erstaunlicherweise ähnelt der Aufbau des Cdc20-Degrans stark den minimalen Domänen für Cdh1-abhängige Degradation, welche für die Polo-Kinase Cdc5 in einer parallelen Arbeit

(Arnold *et al.*, 2015) und für das Spindelmotorprotein Cin8 (Hildebrandt und Hoyt, 2001) beschrieben wurden (Abb. 5.3). Die minimalen Abbausequenzen von Cdc5 und Cin8 befinden sich wie das Cdc20-Degron an den äußersten Enden ihrer Proteine und sind mit 80 bzw. 83 Aminosäuren von vergleichbarer Größe. Das APC/C-Erkennungssignal des Cdc5-Degrone setzt sich aus einer essentiellen KEN-Box und einer unterstützenden D-Box zusammen (Arnold *et al.*, 2015). Für die Instabilität des Cin8-Degrone waren ebenfalls eine KEN-Box und ein weiterer Sequenzabschnitt notwendig, den die Autoren als Element 2 bezeichneten (Hildebrandt und Hoyt, 2001). Trotz der unterschiedlichen Zusammensetzung des Abbausignals wurden die Degrone spezifisch durch Cdh1 und nicht durch Cdc20 erkannt (diskutiert in Kapitel 5.5). Ebenso wie in dem Cdc20-Segment werden die APC/C-Erkennungssignale des Cdc5- und des Cin8-Degrone C-terminal von einer NLS flankiert, die für den Cdh1-abhängigen Abbau erforderlich ist und zudem ein RxxL-Motiv enthält (Abb. 5.3). In allen drei Fällen konnte das RxxL-Motiv der NLS als Degradationssignal ausgeschlossen werden und die native NLS ließ sich durch eine heterologe NLS ohne RxxL-Motiv ersetzen (Abb. 4.14 und 4.15; Hildebrandt und Hoyt, 2001; Arnold *et al.*, 2015). Daher scheint nicht die Sequenz der NLS an sich, sondern allgemein eine Lokalisation im Zellkern notwendig für die APC/C-Cdh1-vermittelte Degradation zu sein (diskutiert in Kapitel 5.3). Der ähnliche Aufbau der Degradationsdomänen, ihre Lage an den N- bzw. C-terminalen Enden ihrer Proteine und das Vorhandensein eines RxxL-Motivs innerhalb ihrer NLS lassen vermuten, dass sich die Degron-Elemente möglicherweise aus einem gemeinsamen Vorläufer-Modul entwickelt haben. Dieses Modul könnte im Laufe der Evolution mit verschiedenen Proteinen verknüpft worden sein, um deren Verfügbarkeit im Zellzyklus mittels APC/C-Cdh1-abhängiger Degradation zu regulieren.

Für manche APC/C-Substrate wurde beschrieben, dass ihr Abbaubeginn nicht nur durch die zeitliche Regulation der APC/C-Aktivität, sondern auch durch post-translationale Modifikation auf Ebene des Substrats gesteuert wird. Zumindest im Fall der Substrate Cdc6 in humanen Zellen (Mailand und Diffley, 2005) und Pds1 sowie Dbf4 in *S. cerevisiae* (Holt *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2014) führten Phosphorylierungen im Bereich ihrer APC/C-Erkennungssignale zu einer Stabilisierung der Proteine. In unmittelbarer Nähe der D-Box von Cdc20 in *S. cerevisiae* befindet sich ein SPTK-Motiv (beginnend ab Position 24), das der vollen Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch Cdks entspricht (Abb. 4.17). Bislang wurde für diese Position noch keine Phosphorylierung *in vivo* beschrieben und die

Bedeutung der Phosphorylierung von Cdc20 in *S. cerevisiae* ist noch nicht umfassend untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch an, dass der D-Box-abhängige Abbau von Cdc20 durch Phosphorylierung reguliert sein könnte. So führte die Nachahmung einer dauerhaften Phosphorylierung der potentiellen Cdk-Phosphorylierungsstelle im Bereich der D-Box sowohl zu einem verzögerten Abbaubeginn als auch zu reduzierten Degradationsraten für Cdc20(1-80)-GFP (Abb. 4.17). Dies lässt vermuten, dass die Phosphorylierung an dieser Position die Erkennung der D-Box und dadurch die anschließende Ubiquitinierung von Cdc20 durch APC/C-Cdh1 beeinträchtigt. Um diese Theorie zu festigen, müsste in weiteren Studien zunächst bewiesen werden, dass das Cdk-Motiv an der D-Box von Cdc20 *in vivo* phosphoryliert wird. Außerdem müsste der Nachweis erbracht werden, dass die Phosphorylierung an dieser Position die Ubiquitinierung von Cdc20 durch APC/C-Cdh1 tatsächlich stört.

Die Verhinderung einer Phosphorylierung an dieser Position durch eine Alanin-Substitution bewirkte jedoch keine verfrühte Degradation von Cdc20(1-80)-GFP (Abb. 4.17). Dies könnte durch den Umstand bedingt sein, dass Cdh1 in der frühen Mitose durch Phosphorylierung inaktiviert ist und Cdc20 vor der Anaphase nicht für den Abbau markieren kann (Abb. 4.8; Zachariae *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999). Zudem konnte für Cdc20 bislang nur eine Auto-Ubiquitinierung *in cis*, aber keine D-Box-abhängige Degradation von Cdc20 durch ein weiteres Cdc20-Molekül *in trans* nachgewiesen werden (Foe *et al.*, 2011). Ebenso konnte in dieser Arbeit für das Cdc20(1-80)-Fragment keine Cdc20-vermittelte Degradation verzeichnet werden (diskutiert in Kapitel 5.5). Das Fehlen eines geeigneten Aktivators könnte daher der Grund dafür sein, dass der Abbau von Cdc20(1-80)-GFP trotz der S24A-Mutation nicht früher im Zellzyklus einsetzt.

Es ist wenig wahrscheinlich, dass die Cdk1-Phosphorylierung den Abbau von Cdc20 relativ zur Aktivierung von Cdh1 verzögert, da Cdc20 und Cdh1 nach der beginnenden Inaktivierung von Cdk1 und anschließender Freisetzung der Phosphatase Cdc14 in der Anaphase vermutlich zeitgleich dephosphoryliert werden. Es wäre denkbar, dass die Phosphorylierung der D-Box von Cdc20 den Wechsel der Aktivatoren am APC/C unterstützen und wie folgt robuster gestalten könnte. In der frühen Mitose ist Cdc20 an der D-Box phosphoryliert und bindet den APC/C als Aktivator. Nachdem APC/C-Cdc20 die Aktivität von Cdk1 reduziert hat, wird die De-Phosphorylierung des späten Aktivators Cdh1 möglich, der anschließend mit Cdc20 um die Aktivator-Position am APC/C konkurriert. Die Auto-Ubiquitinierung von Cdc20

bei abnehmender Substratkonzentration (Foe *et al.*, 2011) führt zu einer Abnahme von APC/C-gebundenem Cdc20 und begünstigt die Bindung von Cdh1. Gleichzeitig könnte die De-Phosphorylierung der D-Box von nicht an den APC/C gebundenen Cdc20-Molekülen dazu führen, dass freies Cdc20 nicht mehr nur als Aktivator, sondern auch als Cdh1-Substrat an den APC/C bindet, wodurch ein rascher Wechsel der Aktivatoren weiter gefördert würde.

5.3 Die APC/C-Cdh1-abhängige Degradation ist auf den Zellkern beschränkt

Frühere Studien haben bereits angedeutet, dass die APC/C-abhängige Degradation in *S. cerevisiae* primär im Zellkern erfolgen könnte. So wurden bislang die Untereinheiten des APC/C und der frühe Aktivator Cdc20 ausschließlich im Zellkern detektiert (Zachariae *et al.*, 1996; Shirayama *et al.*, 1998; Jaquenoud *et al.*, 2002; Melloy und Holloway, 2004). Zudem ist für den Abbau der Cdc20-Substrate Kip1 und Pds1 das Vorhandensein einer NLS im Substrat (Kip1) bzw. ein intaktes Kernimportsystem (Pds1) notwendig (Baumer *et al.*, 2000; Gordon und Roof, 2001). Die Degradation des Spindelmotorproteins und Cdh1-Substrats Cin8 erforderte ebenfalls eine NLS in Cin8 (Hildebrandt und Hoyt, 2001). Außerdem konnte Cdh1 in der späten Mitose und G1-Phase, zu Zeitpunkten in denen die APC/C-Cdh1-Isoform aktiv ist, im Zellkern nachgewiesen werden, während es in den übrigen Zellzyklusphasen im Zytoplasma detektiert wurde (Jaquenoud *et al.*, 2002). Gleichzeitig wurde für nukleäres Cdh1 eine erhöhte Aktivität gegenüber im Zytoplasma befindlichem Cdh1 beobachtet. All diese Daten lassen vermuten, dass sowohl die Aktivität von APC/C-Cdc20 als auch von APC/C-Cdh1 auf den Zellkern beschränkt ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen diese Ansicht speziell für APC/C-Cdh1. Erstens zeigten Derivate von Cdh1, die nicht im Zellkern lokalisierten, eine reduzierte Interaktion mit dem APC/C *in vivo* (Abb. 4.8 – 4.10). Zweitens verhinderte die Deletion der nativen NLS in Cdc20(1-80) nicht nur die Lokalisation des Degrons im Zellkern, sondern bewirkte auch eine Stabilisierung des Konstrukts (Abb. 4.15 B). Noch wichtiger ist, dass mit Hilfe einer heterologen NLS sowohl die fehlerhafte Lokalisation als auch die Stabilisierung wieder aufgehoben werden konnte (Abb. 4.15 E). Vergleichbare Effekte konnten auch für die Substrate Cin8 und Cdc5 beobachtet werden (Hildebrandt und Hoyt, 2001; Arnold *et al.*, 2015). Drittens konnte das Cdc20-Degron, ebenso wie das Cdc5-Degron (Arnold *et al.*, 2015), durch erzwungene Lokalisation im Zytoplasma, die durch Fusion an eine potente NES erreicht wurde, stabilisiert werden (Abb. 4.16). Vor allem die Stabilität der zytoplasmatischen Degron-NES-Konstrukte spricht gegen eine substantielle APC/C-Cdh1-

Aktivität im Zytoplasma und unterstreicht die räumliche Begrenzung der APC/C-Cdh1-vermittelten Degradation auf den Zellkern. Durch Lokalisierung der Cdc20- und Cdc5-Degrone in verschiedene Subkompartimente des Zellkerns wurde zudem deutlich, dass der APC/C-Cdh1-abhängige Abbau maximal ist, wenn das Substrat frei zugänglich im Nukleoplasma vorliegt (Abb. 4.16; Arnold *et al.*, 2015).

Die Beschränkung der APC/C-Cdh1-Aktivität auf den Zellkern impliziert, dass zytoplasmatische Substrate zunächst in den Zellkern importiert werden müssen, um durch APC/C-Cdh1 für den Abbau markiert zu werden. Mit den Proteinen Iqg1 und Hsl1 wurden Cdh1-Substrate identifiziert (Burton und Solomon, 2000; Ko *et al.*, 2007), die bislang nur im Zytoplasma und am Knospenhals, aber nicht im Zellkern detektiert werden konnten (Epp und Chant, 1997; Barral *et al.*, 1999; Crutchley *et al.*, 2009; Naylor und Morgan, 2014). Zwar lokalisiert Cdh1 nach dem Export aus dem Zellkern ebenso wie Hsl1 und Iqg1 am Knospenhals (Abb. 4.1), allerdings ist es unwahrscheinlich, dass Cdh1 an dieser Struktur aktiv ist. Zum einen befindet sich Cdh1 nur in solchen Zellzyklusphasen am Knospenhals, in denen der Aktivator an den Cdk-Motiven der NTD phosphoryliert ist und dadurch nicht an den APC/C binden kann, und zum anderen konnte der APC/C bislang nicht am Knospenhals detektiert werden (Abb. 4.8 und Abb. 8.3 im Anhang; Zachariae *et al.*, 1996; Jaquenoud *et al.*, 2002; Melloy und Holloway, 2004). Darüber hinaus beginnt der Abbau von Iqg1 sehr spät in der Mitose zu einem Zeitpunkt, an dem Cdh1 den Knospenhals bereits verlassen hat und sich im Zellkern befindet (Abb. 4.1 und 4.2; Arnold *et al.*, 2015). Daher ist anzunehmen, dass die Ubiquitinierung der Substrate Hsl1 und Iqg1 im Zellkern stattfindet. Vermutlich erfolgt die Ubiquitinierung und anschließende Degradation der Proteine unmittelbar auf ihren Kernimport, sodass diese Proteine nicht ausreichend im Zellkern akkumulieren, um in diesem Kompartiment nachweisbar zu sein.

Neben der Zellzyklus-regulierten Aktivierung von Cdh1 und der maskierenden Phosphorylierung von APC/C-Erkennungssignalen in Substraten könnte die räumliche Begrenzung der Aktivität von APC/C-Cdh1 auf den Zellkern als weiterer Mechanismus dienen, um die Stabilität von Cdh1-Substraten und die Reihenfolge ihrer Degradation zu kontrollieren. So könnten Substrate durch Lokalisation im Zytoplasma vor der APC/C-Cdh1-abhängigen Degradation geschützt werden und der Beginn ihres Abbaus würde durch den Zeitpunkt ihres Imports in den Zellkern bestimmt werden. Im Einklang mit dieser Hypothese konnte beobachtet werden, dass der Abbau des zytoplasmatischen Cdh1-Substrats Iqg1

später einsetzt als die Degradation des nukleären Substrats Ase1 (Arnold *et al.*, 2015). Somit könnte die zeitliche Kontrolle der APC/C-Cdh1-abhängigen Degradation in der Tat auch auf Ebene der subzellulären Lokalisation der Substrate realisiert sein. Diese zeitlich-räumliche Kontrolle des APC/C-Cdh1-Proteolysewegs könnte auch in höheren Eukaryoten existieren. So befinden sich der APC/C und Cdh1 in Säugerzellen während der G1-Phase ebenfalls im Zellkern (Jorgensen *et al.*, 1998; Gieffers *et al.*, 1999; Topper *et al.*, 2002). Darüber hinaus war die Translokation des humanen Skp2-Proteins in den Zellkern eine Voraussetzung für dessen APC/C-Cdh1 vermittelte Degradation, die durch die Aktivierung des TGF- β -Signalwegs induziert wurde (Hu *et al.*, 2011). Auch im Fall der Methyltransferase DNMT1 fand der Cdh1-abhängige Abbau in Säugerzellen im Zellkern statt und erforderte neben einem KEN-Motiv auch das Vorhandensein einer NLS (Ghoshal *et al.*, 2005). Gerade in post-mitotischen Zellen höherer Eukaryoten, in denen APC/C-Cdh1 an der Regulation des Metabolismus, der Zelldifferenzierung und des Überlebens neuronaler Zellen beteiligt ist (Eguren *et al.*, 2011; Almeida, 2012), könnte die zeitlich-räumliche Kontrolle der APC/C-Cdh1-abhängigen Degradation auf Ebene der Substrat-Lokalisation von besonderer Bedeutung sein.

5.4 Die Aktivatoren besitzen multiple Interaktionsmotive zur Bindung und Aktivierung des APC/C

Für die Ubiquitinierung von APC/C-Substraten ist die Bindung der Aktivatoren Cdc20 und Cdh1 an den APC/C aus zweierlei Gesichtspunkten fundamental. Zum einen fungieren die Aktivatoren als Adaptorproteine für die Erkennung und Bindung der Substrate (Buschhorn *et al.*, 2011; da Fonseca *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013). Zum anderen werden die Aktivatoren, unabhängig von ihrer Funktion in der Substratrekrutierung, für die katalytische Aktivität des APC/C benötigt. Hinweise hierfür lieferte eine Arbeit mit Eizell-Extrakten aus *Xenopus laevis*, in denen das Substrat Nek2A in Abwesenheit von Cdc20 nicht degradiert wurde (Kimata *et al.*, 2008), obwohl Nek2A direkt und Aktivator-unabhängig an den APC/C binden kann (Hames *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2006; Sedgwick *et al.*, 2013). Die Aktivierung des APC/C scheint auf der Interaktion mit der NTD der Aktivatoren zu basieren, da die NTD von Cdc20 in den *Xenopus*-Experimenten sowohl hinreichend als auch notwendig für die APC/C-abhängige Ubiquitinierung von Nek2A *in vitro* sowie die Degradation des Proteins *in vivo* war (Kimata *et al.*, 2008). Dabei stellte sich die C-Box als kritisches Element für die Aktivierung des APC/C heraus. Die NTD von Cdc20 war allerdings nicht fähig, die

Ubiquitinierung und Degradation von Securin und Cyclin B zu unterstützen, für die keine Aktivator-unabhängige Rekrutierung an den APC/C bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Die Überexpression der NTD von Cdc20 über einen Zeitraum von 8 h führte zu einer Abnahme der Proteinlevel des S-Phase-Cyclins Clb5, wirkte sich jedoch nicht auf die Proteinmenge des M-Phase-Cyclins Clb2 und nur geringfügig auf die Proteinmenge von Pds1 (Securin) aus (Abb. 4.19). Dagegen verringerte die Überexpression von *CDC20* in voller Länge bereits nach 1 h die Proteinlevel von sowohl Clb5 als auch Pds1 deutlich (Abb. 4.24). In Anlehnung an die Daten von Kimata *et al.* (2008) wäre eine mögliche Erklärung, dass Clb5 im Gegensatz zu Clb2 und Pds1 auch ohne Rekrutierung durch einen Aktivator mit dem APC/C interagieren kann und dadurch stärker von der Aktivierung des APC/C durch die Cdc20-NTD betroffen ist. Im Einklang mit dieser Theorie scheint die Degradation von Clb5 unter anderem einen Mechanismus zu umfassen, der auf der Interaktion mit Cdk1 und Cks1 beruht und vermutlich, ähnlich wie im Fall von Cyclin A, eine Cdc20-unabhängige Bindung an den APC/C ermöglicht (Wolthuis *et al.*, 2008; Di Fiore und Pines, 2010; Lu *et al.*, 2014). Dagegen gibt es noch keine Hinweise für eine Aktivator-unabhängige Wechselwirkung der Substrate Clb2 und Pds1 mit dem APC/C. Da die NTD von Cdc20 nach Überexpression Clb5 in geringerem Umfang destabilisieren konnte als Cdc20 in voller Länge (Abb. 4.19 und 4.24), scheint die Rekrutierung von Clb5 durch die WD40-Domäne von Cdc20 der vorwiegende und effizienteste Mechanismus für die Ubiquitinierung von Clb5 zu sein (siehe auch Kapitel 5.5). Die Aktivierung des APC/C durch die Überexpression der Cdc20-NTD führte zu einem Wachstumsdefekt (Abb. 4.18), der vornehmlich durch Replikationsstörungen infolge der reduzierten Clb5-Level erklärt werden kann (Abb. 4.19). Eine C-terminale Verkürzung der NTD um den Sequenzbereich, der das Mad2-Interaktionsmotiv (MIM) enthält, verringerte den negativen Effekt auf das Zellwachstum (Abb. 4.18). Dies deutet darauf hin, dass sich in der betreffenden Region neben dem MIM ein wichtiges Sequenzelement zur Aktivierung des APC/C verbirgt. Im Fall von humanem Cdc20 überlappt die Mad2-Bindestelle mit einem Sequenzmotiv, das für die Bindung und Aktivierung des APC/C bedeutend ist und entsprechend seiner Aminosäuresequenz als KILR-Motiv bezeichnet wurde (Zhang und Lees, 2001; Izawa und Pines, 2012). Eine kürzlich veröffentlichte Struktur von APC/C-Cdc20 zeigt, dass die hydrophoben Aminosäuren des KILR-Motivs an Apc8/Cdc23 binden und die Konformation der C-Box stabilisieren (Zhang *et al.*, 2016). In Cdc20 aus *S. cerevisiae* befindet

sich im Bereich des MIM ebenfalls ein Motiv, das in seiner Sequenz (KRIL) dem KILR-Motiv ähnelt (Abb. 8.1 im Anhang). Die ähnliche Sequenz sowie die Position der Motive in der Nähe des MIM lassen vermuten, dass es sich um konservierte Sequenzelemente handelt, die mit der APC/C-Untereinheit Apc8/Cdc23 interagieren und zur Aktivierung des APC/C beitragen.

In Übereinstimmung mit den Arbeiten in *Xenopus laevis* konnte die C-Box als weiteres, wichtiges Bindemotiv für die Aktivierung des APC/C nachgewiesen werden, da die Deletion der C-Box den Wachstums-hemmenden Effekt der NTD nach Überexpression reduzierte (Abb. 4.21). Überraschenderweise schwächte auch die Mutation des RxxL1-Motivs, das als funktionelle D-Box identifiziert wurde (Abb. 4.14), den negativen Effekt der NTD auf das Zellwachstum ab (Abb. 4.21). Darüber hinaus zeigte die Mutation von RxxL1 einen synthetischen Effekt mit der Deletion des C-terminalen IR-Motivs (Abb. 4.22), das als APC/C-Bindemotiv fungiert und mit der Untereinheit Cdc27 interagiert (Vodermaier *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2016). Diese Daten lassen vermuten, dass das RxxL1-Motiv nicht nur zur negativen Regulation von Cdc20 durch Cdh1-abhängige Degradation beiträgt, sondern auch die Bindung und Aktivierung des APC/C durch Cdc20 unterstützt. Die mögliche Bindestelle für das RxxL1-Motiv in dem APC/C-Komplex muss in künftigen Studien noch identifiziert werden. Dabei ist es unwahrscheinlich, dass der D-Box Co-Rezeptor aus der eigenen WD40-Domäne und der APC/C-Untereinheit Doc1/Apc10 für die aktivierende Bindung des RxxL1-Motivs genutzt wird. Diese Form der Selbstinteraktion würde einerseits den Zugang für D-Box-Substrate blockieren und andererseits eher die Auto-Ubiquitinierung von Cdc20 unterstützen (Foe *et al.*, 2011) als die Aktivität von APC/C-Cdc20 zu erhöhen. In diesem Zusammenhang wäre es vorstellbar, dass durch eine Phosphorylierung der potentiellen Cdk-Phosphorylierungsstelle im Bereich des RxxL1-Motivs festgelegt wird, ob RxxL1 mit dem D-Box-Rezeptor für eine anschließende Ubiquitinierung interagiert oder den APC/C als aktivierendes Motiv an anderer Stelle kontaktiert. Da das Cdc20-Degron durch eine Phosphat-imitierende Mutation an dem betreffenden Cdk-Motiv stabilisiert wurde (Abb. 4.17 und Kapitel 5.2), könnte die Phosphorylierung im Bereich des RxxL1-Motivs die aktivierende APC/C-Interaktion begünstigen. Der relative Beitrag des RxxL1-Motivs zur APC/C-Aktivierung ist als eher gering zu bewerten, da sich die rxxl1-Mutation alleine kaum auf die Funktion von Cdc20 auswirkte (Abb. 4.22 – 4.24), sondern sich nur bei reduzierter APC/C-Bindung (im Kontext von Cdc20(1-248)-GFP oder cdc20 Δ IR) ausprägte (Abb. 4.21 – 4.23). Möglicherweise dient die Interaktion über RxxL1 zur Feinjustierung der Position von

Cdc20 im APC/C-Komplex, um die katalytische Aktivität und/oder die Rekrutierung der Substrate zu optimieren.

Aktuelle Strukturdaten lassen erkennen, dass die Aktivatoren die zahlreichen APC/C-Bindemotive nutzen, um multiple Kontakte mit verschiedenen Untereinheiten des APC/C einzugehen (Chang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016). Die multiplen Wechselwirkungen stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit die Grundlage für die Konformationsänderungen im APC/C-Komplex dar, die durch die Bindung des Aktivators hervorgerufen werden (Dube *et al.*, 2005; Herzog *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014). Die Bindung des Aktivators führt zu einer Anhebung und größeren Flexibilität des katalytischen Subkomplexes aus Apc2-Apc11 (Chang *et al.*, 2014), wodurch der Transfer von Ubiquitin auf das Substrat oder auf bereits übertragende Ubiquitin-Moleküle erleichtert werden könnte. Zudem scheinen die durch den Aktivator ausgelösten Konformationsänderungen im APC/C-Komplex die Rekrutierung des E2-Enzyms an den APC/C zu erhöhen und dessen Bindung als E2-Ubiquitin-Konjugat in der aktivierten Konformation zu unterstützen (Chang *et al.*, 2014; Kelly *et al.*, 2014; Van Voorhis und Morgan, 2014). Obwohl die APC/C-Bindemotive sowie ihre relativen Positionen, insbesondere der C-Box, in den N-terminalen Domänen der Aktivatoren zum Teil variieren, konnte in dieser Arbeit die NTD von Cdc20 ohne Funktionsverlust durch die NTD von Cdh1 ersetzt werden, sofern die negative Regulation durch Cdk1 inaktiviert wurde (Abb. 4.26 – 4.28). Dies lässt vermuten, dass die N-terminalen Domänen von Cdc20 und Cdh1 die Aktivität des APC/C gleichermaßen stimulieren können.

5.5 Die WD40-Domänen von Cdc20 und Cdh1 unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität

Die unterschiedliche Substratspezifität der Aktivatoren und ihre sequentielle Bindung an den APC/C im Laufe des Zellzyklus legen grundlegend die zeitliche Reihenfolge in der Degradation der APC/C-Substrate fest (Peters, 2006). Auch wenn mittlerweile die Rezeptorstellen für die D- und KEN-Boxen in Cdc20 und Cdh1 identifiziert werden konnten (Chao *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013), ist die molekulare Grundlage für die unterschiedlichen Substratspezifitäten der Aktivatoren nach wie vor unklar. Da die Bindestellen für die D- und die KEN-Box in Cdc20 und Cdh1 konserviert sind, ist in erster Näherung anzunehmen, dass diese Abbausignale nicht zu der selektiven Bindung an entweder Cdc20 oder Cdh1 beitragen. Vielmehr ist zu vermuten, dass die Bindung der D- oder KEN-Box ein grundlegender Schritt in

der Substraterkennung ist, der durch beide Aktivatoren gleichermaßen erfolgt. Daher ist es bemerkenswert, dass das kurze Degron-Konstrukt Cdc20(1-80)-GFP, das als relevantes APC/C-Erkennungssignal eine einzelne D-Box besitzt, sowohl in der frühen Mitose, wenn die Aktivität von APC/C-Cdc20 hoch ist, als auch in Abwesenheit von Cdh1 stabil war (Abb. 4.13 und 8.6 im Anhang). Daraus lässt sich schließen, dass das Degron-Konstrukt trotz der Anwesenheit einer kanonischen D-Box nicht durch Cdc20, sondern ausschließlich durch Cdh1 erkannt werden kann. Ein vergleichbarer Befund konnte in einer parallelen Arbeit für das Cdc5-Degron erhoben werden, welches sowohl eine KEN-Box als auch eine D-Box als APC/C-Erkennungssignale enthält (Arnold *et al.*, 2015).

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Cdc20- und Cdc5-Degrone Sequenzen tragen, die eine spezifische Erkennung durch Cdh1 bewirken. Hinweise auf solche Aktivator-spezifische Bindemotive liefert eine Kristallstruktur eines Komplexes aus der WD40-Domäne von Cdh1 und einem Fragment seines Inhibitors Acn1 (He *et al.*, 2013). Das kristallisierte Acn1-Fragment umfasste die zentrale, inhibitorische Region (CIR, *central inhibitory region*) von Acn1, welche ähnlich wie die Degron-Konstrukte D- und KEN-Box-Motive zur Bindung an die entsprechenden Rezeptorstellen auf der WD40-Domäne enthält (Abb. 5.3; He *et al.*, 2013). Zusätzlich zu diesen APC/C-Erkennungssignalen besitzt die CIR noch ein A-Motiv (EETAE), das für die Inhibition von Cdh1 durch Acn1 von Bedeutung ist (Burton *et al.*, 2011). Gemäß der Kristallstruktur interagiert das A-Motiv mit einem Bereich der WD40-Domäne, der in Cdc20 nicht konserviert ist (He *et al.*, 2013). Daher wird die Interaktion über das A-Motiv als eine der Ursachen dafür vermutet, dass Acn1 spezifisch Cdh1, aber nicht Cdc20, inhibiert (Enquist-Newman *et al.*, 2008; He *et al.*, 2013). Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass dieser wenig konservierte Bereich der WD40-Domäne sowohl von Cdc20 als auch von Cdh1 für die spezifische Wechselwirkung mit Proteinen genutzt wird (Lu *et al.*, 2014; Di Fiore *et al.*, 2015). In diesem Zusammenhang wurde das ABBA-Motiv beschrieben, das in Acn1 eine Erweiterung des A-Motivs darstellt und unter anderem auch in humanem Cyclin A und Clb5 aus *S. cerevisiae* gefunden wurde. Während das ABBA-Motiv in Acn1 die spezifische Bindung an Cdh1 vermittelt, dienen die ABBA-Motive von Clb5 und Cyclin A der selektiven Bindung an Cdc20 (He *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014; Di Fiore *et al.*, 2015). Offensichtlich bestimmen nicht-konservierte Aminosäuren innerhalb des ABBA-Motivs oder in dessen Umgebung, von welchem Aktivator das Motiv gebunden werden kann. Weder das Cdc20-Degron noch das Cdc5-Degron besitzen jedoch Sequenzmotive, die dem ABBA- oder dem kürzeren A-Motiv

ähneln (Abb. 5.3). Darüber hinaus weisen die Degron-Konstrukte abgesehen von den RxxL-Motiven keinerlei Sequenzähnlichkeiten zueinander auf. Möglicherweise existiert eine Vielfalt an Sequenzmotiven für die Cdh1-spezifische Bindung und die WD40-Domäne von Cdh1 hält viele verschiedene Bindestellen für individuelle Interaktionen mit seinen Substraten bereit. Alternativ könnten strukturelle Motive, die auf Ebene der linearen Aminosäuresequenz nicht erkennbar sind, für die Cdh1-spezifische Bindung verantwortlich sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weitere Hinweise für Substrat-spezifische Bindestellen in den WD40-Domänen gefunden und es konnte zudem gezeigt werden, dass die unterschiedliche Spezifität der Aktivatoren durch Unterschiede in den WD40-Domänen bedingt ist. Zumindest im Fall von Cdc20 konnte die WD40-Domäne funktionell nicht durch die WD40-Domäne von Cdh1 ersetzt werden, da das betreffende N20WD1-Konstrukt die Deletion von *CDC20* nicht komplementieren konnte (Abb. 4.26 und Abb. 8.14 im Anhang; Wegerer, 2004). Im Gegensatz dazu ließ sich die NTD von Cdc20 ohne erkennbaren Einfluss auf Zellwachstum und Zellzyklusprogression durch die NTD von Cdh1 austauschen, sofern die inhibitorischen Cdk-Phosphorylierungsstellen in der NTD von Cdh1 entfernt wurden (Abb. 4.26 und 4.27). In der Tat war die resultierende Chimäre N1mpWD20 in der Lage, in Abwesenheit von Cdc20 die Fluktuation der Cdc20-Substrate Clb5 und Pds1 aufrechtzuerhalten (Abb. 4.27). Die Proteinmenge von N1mpWD20 blieb anders als im Fall von Cdc20 im Zellzyklus konstant und die Chimäre entging zudem der Regulation durch den SAC (Abb. 4.27 und 4.28), da N1mpWD20 die entsprechenden Regulationselemente (RxxL1 und MIM) der NTD von Cdc20 fehlen. Die daraus resultierende, konstitutive Anwesenheit von aktivem N1mpWD20 wirkte sich spezifisch auf die Akkumulation der Cdc20-Substrate Clb5 und Pds1 aus, jedoch nicht auf das Substrat Clb2 (Abb. 4.27), dessen Stabilität hauptsächlich durch Cdh1 kontrolliert ist (Visintin *et al.*, 1997; Yeong *et al.*, 2000; Schwab *et al.*, 2001; Wäsch und Cross, 2002; Lu *et al.*, 2014). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die N-terminale Domäne, zumindest im Fall von Cdc20, keinen Beitrag zu der Spezifität des Aktivators leistet und vielmehr eine austauschbare Regulations- und Aktivierungsdomäne darstellt. Dies impliziert, dass die unterschiedliche Substratspezifität von Cdc20 und Cdh1 auf den WD40-Domänen beruhen muss, die sich funktionell voneinander unterscheiden.

Um die Bereiche in den WD40-Domänen zu identifizieren, die für die unterschiedliche Substratspezifität von Cdc20 und Cdh1 verantwortlich sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit

ein genetischer Screen entwickelt. Hierzu wurde die WD40-Domäne von Cdh1 im Kontext des *N20WD1*-Konstrukts per *error-prone*-PCR mutagenisiert und die resultierenden Mutanten anschließend auf ihre Fähigkeit getestet, Wachstum in Abwesenheit von *CDC20* und *CLB5* zu ermöglichen. Da Clb5 und Pds1 die essentiellen Substrate des APC/C in *S. cerevisiae* sind (Thornton und Toczyski, 2003), wurde unter diesen Bedingungen nach Unterschieden in den WD40-Domänen gesucht, welche die spezifische Erkennung von Pds1 durch die WD40-Domäne von Cdc20 betreffen. Tatsächlich konnte die WD40-Domäne von Cdh1 durch die Zufallsmutagenese derart verändert werden, dass einige der mutierten *N20WD1*-Konstrukte die Funktion von Cdc20 unter den gewählten Bedingungen übernehmen konnten (Abb. 4.29). Dieser Umstand beweist, dass die Chimäre *N20WD1* grundsätzlich ein funktionelles Aktivator-Konstrukt darstellt, das sich in seiner Spezifität von Cdc20 unterscheidet.

Die gefundenen *N20WD1*-Mutanten konnten Cdc20 jedoch nicht ersetzen, wenn das *CLB5*-Gen intakt war und die Chimäre somit neben Pds1 auch Clb5 für den Abbau markieren musste (Abb. 4.31). Aus dieser Beobachtung lassen sich mehrere Schlüsse ziehen. Zum einen weisen diese Daten darauf hin, dass Clb5, ebenso wie Pds1, nicht durch die WD40-Domäne von Cdh1 an den APC/C rekrutiert werden kann. Vermutlich leistet die Interaktion über das Clb5-ABBA-Motiv, dessen Bindestelle in Cdh1 nicht konserviert ist, einen entscheidenden Beitrag zu der Rekrutierung von Clb5 an den APC/C (Lu *et al.*, 2014). Gleichzeitig bedeutet dies, dass die Aktivator-unabhängige APC/C-Interaktion von Clb5 über Cks1 (siehe Kapitel 5.4) allein nicht für die notwendige Degradation von Clb5 ausreichend ist. Zum anderen scheinen die Mutationen die Spezifität von *N20WD1* nur partiell zu ändern und gezielt die Erkennung von Pds1 zu ermöglichen. Somit muss die spezifische Erkennung von Pds1 auf anderen Sequenzmotiven und Bindestellen beruhen als im Fall von Clb5.

Die Kartierung der im WD40-Spezifitäts-Screen identifizierten Aminosäurepositionen in einem Modell der WD40-Domäne zeigt, dass sich die Mehrheit der Positionen im Bereich des KEN-Box-Rezeptors auf der Oberseite der WD40-Domäne befindet (Abb. 5.4 und Abb. 8.18-8.24 im Anhang). Neben den Positionen Y265, N405 und N407, die in Cdh1 und Cdc20 identisch sind (Abb. 8.1 im Anhang), ist interessanterweise die im Screen mehrfach gefundene Aminosäure T449 ein Bestandteil des KEN-Box-Rezeptors und zudem nicht zwischen Cdc20 und Cdh1 konserviert (Abb. 5.4 und Abb. 8.1 im Anhang).

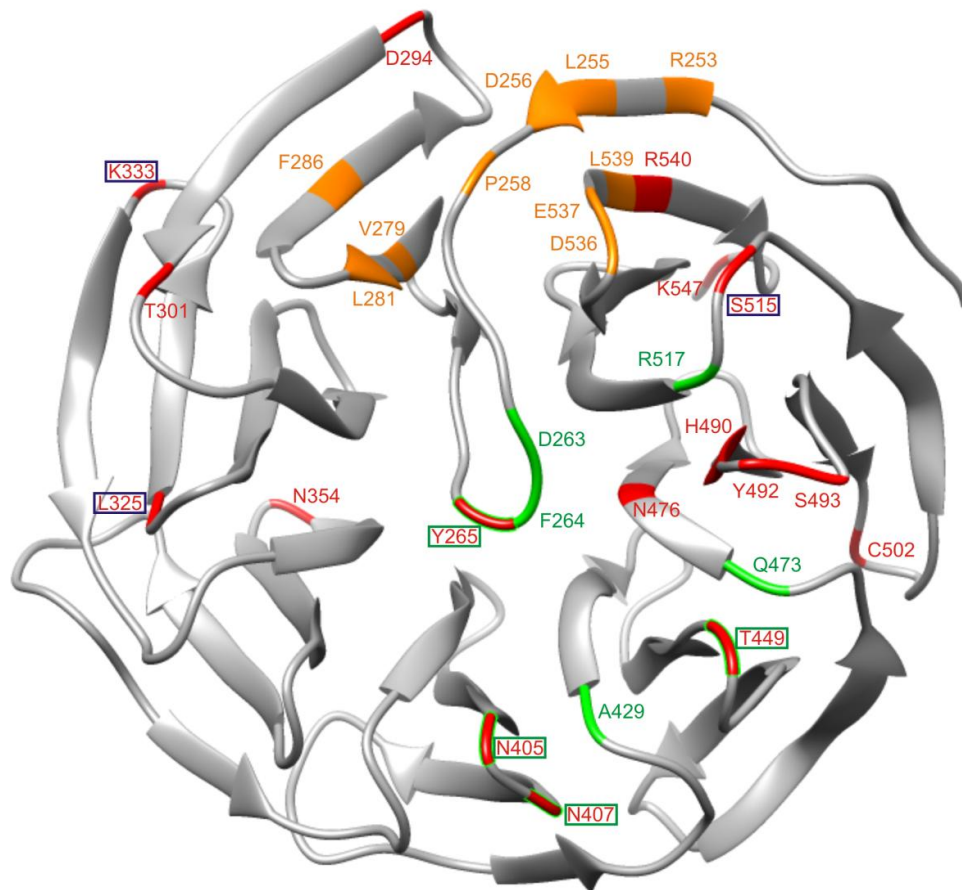


Abbildung 5.4: Position der im WD40-Spezifitäts-Screen identifizierten Aminosäuren in der WD40-Domäne von Cdh1

Modell der WD40-Domäne von Cdh1 aus *S. cerevisiae* basierend auf der publizierten Struktur von He *et al.*, 2013. Die Aminosäuren, die zur Bindung der KEN-Box beitragen, sind grün hervorgehoben und die Aminosäuren der D-Box-Bindestelle sind orange eingefärbt. Die in dem WD40-Spezifitäts-Screen identifizierten Aminosäuren sind rot dargestellt. Die farbigen Rahmen markieren von der Zufallsmutagenese betroffene Aminosäuren, die Bestandteil des KEN-Box-Rezeptors (grün) oder an der Bindung von Acml (blau) beteiligt sind.

Dies wirft die Frage auf, ob die Aktivatoren möglicherweise verschiedene Varianten der KEN-Box erkennen, in denen Aminosäuren in der Umgebung des konservierten KEN-Motivs die selektive Bindung an entweder Cdc20 oder Cdh1 dirigieren.

Weiterhin zeigt die Struktur des Cdh1-Acm1-Komplexes, dass die im Screen gefundenen Aminosäuren L325 und K333 das A-Motiv (als Bestandteil des ABBA-Motivs) von Acml kontaktieren (He *et al.*, 2013). Auch die Aminosäuren Y492 und S515 wurden bereits in einem früheren, genetischen Screen mit der Bindung des A-Motivs in Verbindung gebracht (Burton *et al.*, 2011). Daher wäre es vorstellbar, dass Acml über das ABBA-Motiv und möglicherweise eine spezielle Variante des KEN-Box-Motivs spezifisch an die von Cdh1 stammende WD40-Domäne bindet und dadurch die Komplementation von *cdc20Δ* durch

N20WD1 in der frühen Mitose verhindert, indem der Inhibitor den Zugang für Pds1 blockiert. Allerdings war die Chimäre *N20WD1* auch nach der Deletion von *ACM1* nicht fähig, die Funktion von Cdc20 zu übernehmen (Abb. 8.25 im Anhang). Darüber hinaus wirkte sich die Entfernung von *Acm1* nur in Einzelfällen und dabei sehr unterschiedlich auf das Wachstum der moderat bis geringfügig wachsenden *N20WD1*-Mutanten aus (Abb. 8.25 im Anhang). Während die Deletion von *ACM1* das Wachstum der M21-Mutante in Abwesenheit von Cdc20 verschlechterte, wurde das Wachstum der M1-Mutante unter den gleichen Bedingungen verbessert. Diese gegenläufigen Effekte der *ACM1*-Deletion erschweren eine klare Aussage zur Rolle von *Acm1* für die Spezifität der *N20WD1*-Chimäre. Auch wenn ein möglicher Einfluss von *Acm1* auf die Aktivität von *N20WD1* nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, sprechen die Daten insgesamt dafür, dass eine Inhibition durch *Acm1* nicht primär für die fehlende Komplementationsfähigkeit von *N20WD1* verantwortlich sein kann. Stattdessen scheinen sich die gefundenen Mutationen direkt auf die Erkennung von Pds1 durch die WD40-Domäne von Cdh1 auszuwirken. Denkbar wäre, dass Pds1 ebenso wie Clb5 eine Cdc20-spezifische Variante des ABBA-Motivs besitzt, das durch die gefundenen Änderungen in der A-Motiv/ABBA-Motiv-Bindestelle von Cdh1 besser erkannt wird. Allerdings weist Pds1(1-175) kein Sequenzmotiv auf, das dem Konsensus des ABBA-Motivs (Fx[I/L/V][F/H/Y]x[D/E]; Di Fiore *et al.*, 2015) exakt entsprechen würde.

Bislang konnte ein RxxL-Motiv (beginnend ab Position 85, Abb. 8.26 A im Anhang) als funktionelle D-Box und relevantes Abbausignal in Pds1 identifiziert werden, da die Mutation des RxxL-Motivs Pds1 stabilisierte (Cohen-Fix und Koshland, 1997) und dessen Interaktion mit Cdc20 stark reduzierte (Hilioti *et al.*, 2001). Darüber hinaus besitzt Pds1 unmittelbar an seinem N-terminalen Ende ein KEN-Motiv (beginnend ab Position 8, Abb. 8.26 A im Anhang), das die Ubiquitinierung von Pds1 unterstützen soll (Van Voorhis und Morgan, 2014), aber als Abbausignal noch nicht umfassend untersucht wurde. Da sich die im Screen gefundenen Aminosäuren im Bereich des KEN-Box-Rezeptors häufen, wäre ein weiterer Erklärungsansatz, dass das KEN-Motiv von Pds1 für die spezifische Erkennung durch Cdc20 verantwortlich ist. Erste Untersuchungen zur Degradation von Pds1 sprechen jedoch gegen diese Hypothese. Für diese Experimente wurde ein verkürztes Pds1-Derivat (Pds1(1-175)) verwendet, welchem durch Deletion der C-terminalen 198 Aminosäuren die Separase-inhibierende Domäne entfernt wurde (Hornig *et al.*, 2002), um einen störenden Einfluss des Konstrukts auf die Zellzyklusprogression zu vermeiden. Die Fluktuation des Pds1(1-175)-GFP-Konstrukts

im Zellzyklus entsprach dem für Pds1 zu erwartendem Muster (Abb. 8.26 B und C im Anhang). Im Einklang mit einer verstärkten Expression von *PDS1* am G1/S-Übergang (Yamamoto *et al.*, 1996) stieg die Signalintensität von Pds1(1-175)-GFP mit Knospung der Zellen an und erreichte vor der Anaphase ein Maximum. Noch vor Beginn der Kerntrennung nahm die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals abrupt ab und Pds1(1-175)-GFP war nach beginnender Elongation des Zellkerns nicht mehr zu detektieren. Die Abnahme des Pds1(1-175)-GFP-Signals erfolgte deutlich früher als im Fall des Cdh1-Degrans Cdc20(1-80)-GFP (Abb. 4.12) und ist konsistent mit einer Cdc20-abhängigen Degradation in der Metaphase.

Im Gegensatz zur Mutation der D-Box (RxxL zu AxxA) bewirkte die Inaktivierung des KEN-Motivs (KEN zu AAA) keine Stabilisierung von Pds1(1-175)-GFP, da der Abbau des Pds1(1-175)ken-GFP-Konstrukts zeitgleich und mit vergleichbarer Kinetik erfolgte wie im Fall des WT-Konstrukts (Abb. 8.27 im Anhang). Dies spricht gegen einen entscheidenden Beitrag des KEN-Motivs zu der selektiven Bindung an Cdc20. Möglicherweise besitzt Pds1 ein weiteres Bindemotiv für Cdc20, das entweder spezifisch mit der KEN-Box-Rezeptorvariante von Cdc20 interagiert oder dessen individuelle Bindestelle in der unmittelbaren Umgebung des KEN-Box-Rezeptors von Cdc20 liegt. Die Identifizierung eines solchen Cdc20-spezifischen Bindemotivs in Pds1 könnte mit Hilfe einer systematischen Alanin-Mutagenese der NTD von Pds1 gelingen. Hierbei wäre das in dieser Arbeit hergestellte Pds1(1-175)-GFP-Fusionsprotein ein hilfreiches Konstrukt, um Auswirkungen der Mutationen auf die Stabilität von Pds1 mittels Fluoreszenzmikroskopie quantitativ zu erfassen.

Zusammengefasst deuten die Daten dieser Arbeit an, dass die unterschiedliche Substratspezifität von Cdc20 und Cdh1 auf individuelle Interaktionen zwischen den WD40-Domänen der Aktivatoren und den Substraten zurückgehen könnte. Diese Interaktionen scheinen teilweise auf weniger konservierte Kontaktstellen in den WD40-Domänen zu beruhen, welche mit variablen Sequenzmotiven in den Substraten interagieren. Zusätzlich könnte eine Variabilität in den kanonischen D- und KEN-Box-Motiven zur selektiven Bindung an entweder Cdc20 oder Cdh1 beitragen. Das komplexe Zusammenspiel aus Zellzyklus-regulierter APC/C-Bindung und unterschiedlicher Substratspezifität der Aktivatoren, individueller Mechanismen zur Substratrekrutierung sowie regulierter Zugänglichkeit von Substraten (z. B. durch subzelluläre Lokalisation) oder der APC/C-Bindemotive (z. B. durch Phosphorylierung) gewährleistet hierbei die geordnete und rechtzeitige Degradation der APC/C-Substrate.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Konstruktion der Hefestämme

Alle Hefestämme, die in dieser Arbeit hergestellt wurden oder Anwendung fanden, sind Derivate der Stämme K699, K700 oder K842 mit dem Stammhintergrund W303 und sind in Tabelle 8.2 im Anhang aufgeführt. Die Stämme wurden entweder durch Transformation mit integrativen oder ARS/CEN-Plasmiden (Kapitel 6.1.1) oder durch gezielte Kreuzung mit anschließender Sporulation der diploiden Zygote und Vereinzelung der Sporen generiert (Kapitel 6.1.2).

Die in dieser Arbeit verwendeten Deletionsstämme wurden in früheren oder parallelen Arbeiten der AG Seufert hergestellt und sind nachfolgend kurz beschrieben. Für die Deletion des *CDH1*-Gens wurde die Deletionskassette *bar1Δ::kanMX4* inklusiver flankierender Bereiche von der genomischen DNA des entsprechenden Deletions-Stamms der EUROSCARF-Sammlung mittels PCR (polymerase chain reaction, Kapitel 6.2.2) amplifiziert und über homologe Rekombination am *CDH1*-Genort integriert. Die Deletion des *BAR1*-Gens erfolgte entweder analog oder durch Integration des Plasmids pZV77 (*bar1Δ::kanMX4*; Neutzner, 2003). Bei der *hct1-4*-Mutation handelt es sich um eine Insertion des *HIS3*-Gens in die codierende Region des *CDH1*-Gens. Für die Deletion des *CDC20*-Gens wurde das *HIS3*-Gen über EcoRI- und HincII-Restriktionsschnittstellen aus dem Plasmid pJJ215 (Jones und Prakash, 1990) in ein *CDC20*-Allel auf einem pBluescript-Vektor inseriert und das resultierende Plasmidkonstrukt anschließend an einem der beiden *CDC20*-Genorte des diploiden Stamms K842 integriert (Wegerer, 2004). Die Deletion der Gene *CLB5* und *ACM1* erfolgte nach der PCR-basierten Methode von Longtine und Kollegen durch den Austausch der ORFs (open reading frames) durch das Markergen *HIS3MX6* bzw. *kanMX6* (Longtine *et al.*, 1998). Der Austausch von *CDC20* durch das *pMET3-HA3-CDC20*-Konstrukt für eine regulierbare Expression des *CDC20*-Gens ist an anderer Stelle beschrieben (Uhlmann *et al.*, 2000; D'Ambrosio *et al.*, 2008).

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde auf verschiedene Stämme aus der Sammlung der AG Seufert zurückgegriffen. Der zur Visualisierung des Septins Cdc11 verwendete Stamm enthielt ein *CDC11-3mCherry*-Konstrukt, das am *CDC11*-Genort mittels homologer Rekombination integriert wurde. Zu diesem Zweck wurde das *CDC11*-Gen von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* amplifiziert und mit drei Kopien von *mCherry* in pRS305 fusioniert. Der Stamm zur Visualisierung des Zellkerns enthielt das Konstrukt Kern-Cherry, das sich aus *mCherry* und der für die NLS codierenden Region des Transkriptionsfaktors Swi5 (Moll *et al.*, 1991) zusammensetzt und an anderer Stelle beschrieben wurde (Arnold *et al.*, 2015). Zur Färbung des Nukleolus wurde ein Stamm verwendet, der das Konstrukt *NOP56-3mCherry* exprimiert (Arnold *et al.*, 2015). Für die Visualisierung des APC/C diente ein Stamm mit dem Konstrukt *CDC23-yEGFP*, das mit Hilfe einer PCR-basierten Methode (Sheff und Thorn, 2004) in einer parallelen Arbeit der AG Seufert hergestellt wurde.

Für Co-Immunpräzipitationen und Westernblot-Analysen wurden Stämme aus der Sammlung der AG Seufert verwendet, die folgende Epitopmarkierungen enthielten. Die

Konstrukte *CDC23-MYC9*, *CDC23-HA3* und *PDS1-HA6* sind beschrieben (Zachariae *et al.*, 1996; Ciosk *et al.*, 1998; Camasses *et al.*, 2003). Die Konstrukte *PDS1-MYC13* und *CLB5-FLAG3* sind Epitopmarkierungen, die in früheren Arbeiten der AG Seufert PCR-vermittelt hergestellt wurden (Longtine *et al.*, 1998).

6.1.1 Herstellung von Hefestämmen mittels Transformation

Um Hefestämme mit ARS/CEN- oder integrativen Plasmiden zu transformieren, wurde die Lithiumacetat-Methode angewendet (Gietz und Woods, 2002). Hierzu wurden für jeden Ansatz 2 OD₆₀₀ (ca. 2×10^7) Hefezellen einer wachsenden Kultur in einem 2 ml Reaktionsgefäß geerntet (2 min, 400 x g) und die Zellen zweimal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden zu den Zellen 240 µl PEG 3350 (50%, w/v), 36 µl Liac (1 M), 50 µl Heringssperma-DNA-Lösung und 34 µl DNA-Lösung gegeben. Die Heringssperma-DNA-Lösung wurde durch eine 1:5 Verdünnung von Heringssperma-DNA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5; 1 mM EDTA) hergestellt. Die DNA-Lösung enthielt entweder 0,5 µl eines ARS/CEN-Plasmids oder 10 µl einer durch Restriktionsverdau linearisierten Plasmid-DNA (Kapitel 6.1.1.1 und 6.1.1.3), wobei das Volumen jeweils mit sterilem Wasser auf 34 µl aufgefüllt wurde.

Der Transformationsansatz wurde nach sorgfältigem Resuspendieren der Zellen für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Roller und anschließend für 15 min bei 42°C inkubiert. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert, in 150 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf entsprechenden Selektionsplatten (Tabelle 8.9 im Anhang) ausplattiert. Im Fall der Transformation von DNA-Konstrukten, die den Resistenzmarker *kanMX* enthielten, wurden die Zellen zuvor in Vollmedium zur Ausprägung der Resistenz für 3 h bei 30°C kultiviert. Die Inkubation der Transformationsplatten erfolgte für 3 Tage bei 30°C.

6.1.1.1 Herstellung von Stämmen mit stabiler Integration von Plasmid-DNA und Überprüfung der Integrationszahl

Zur stabilen Integration von DNA-Konstrukten in einer oder mehreren Kopien in das Genom von *S. cerevisiae* Zellen wurden die integrativen Plasmid-Vektoren der pRS- (Sikorski und Hieter, 1989) und Ylplac-Serie (Gietz und Sugino, 1988) verwendet. Um die Integration mittels homologer Rekombination zu erleichtern, wurden die Plasmide durch Restriktionsverdau linearisiert (Kapitel 6.2.3.1). Hierzu wurde eine Restriktionsschnittstelle entweder im Zielgen oder im Markergen gewählt, um das Plasmid bevorzugt am entsprechenden Genort zu integrieren.

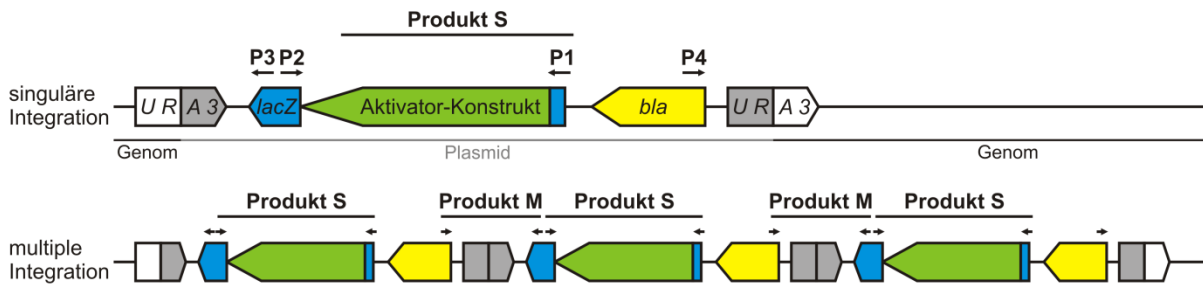


Abbildung 6.1: Unterscheidung einer Einfach- von einer Mehrfachintegration eines Plasmids in das Hefegenom mittels PCR

Die relative Anordnung der Genelemente des integrativen Yiplac211-Plasmids nach singulärer (oben) oder multipler Integration (unten) am *URA3*-Genort (weiß/grau) des Hefegenoms ist gezeigt. Die Pfeile markieren die Position und Orientierung der Oligonukleotide P1 – P4 nach deren Bindung an die komplementären Sequenzen in der Plasmidregion. Die Oligonukleotide P1 und P2 binden in aufeinander zugerichteter Orientierung vor und hinter dem Aktivatorkonstrukt (grün) im Bereich des α -Fragments des *lacZ*-Gens (blau). Sie dienen dem Nachweis einer Integration des Plasmids durch Amplifikation des eingebrachten Aktivatorkonstrukts (Produkt S). Die Oligonukleotide P3 und P4 binden am 3'-Ende des *lacZ*-Fragments bzw. im Bereich des für die β -Lactamase kodierenden *bla*-Gens (gelb). Auf Grund ihrer Orientierung liefern P3 und P4 im Fall einer Einfach-Integration kein Produkt in der PCR. Bei Mehrfach-Integration ermöglichen P3 und P4 jedoch die Amplifikation der *URA3*-Genkopie(n) (Produkt M), die sich zwischen den integrierten Plasmiden befinden.

Speziell die Integration am Ort des Markergens ermöglicht die Integration von Expressions-Konstrukten in multiplen, funktionellen Kopien. Mit Hilfe einer PCR-basierten Methode wurde im Fall der Aktivator-Chimären (Kapitel 4.4.1) die Integration der Konstrukte sowie eine mögliche Mehrfach-Integration überprüft. Hierzu wurden Oligonukleotide entworfen, die sich für die Bestimmung der Integrationszahl von YIplac-Plasmiden eignen (Tabelle 8.6 im Anhang). Das erste Oligonukleotid-Paar aus den *primern* P1 und P2 ist komplementär zu dem *lacZ*-Fragment und dient der Amplifikation des DNA-Konstrukts (Produkt S) für den Nachweis einer Integration des Konstrukts (Abb. 6.1). Die *primer* P3 und P4 des zweiten Oligonukleotid-Paares sind entweder komplementär zu einem weiteren Bereich der *lacZ*-Region oder zu einem Bereich des *bla*-Gens (Abb. 6.1). Die Orientierung von P3 und P4 ist so gewählt, dass bei einfacher Integration des Konstrukts keine produktive Amplifikation möglich ist. Bei Mehrfach-Integration erlauben P3 und P4 dagegen die Amplifikation der *URA3*-Genkopie(n), die sich zwischen den integrierten Plasmidkopien befinden (Produkt M). Das Oligonukleotid-Paar P3 und P4 diene somit dem Nachweis einer mehrfachen Integration des Plasmids.

Für die Überprüfung der Integrationszahl wurde die genomische DNA aus den zu testenden Stämmen isoliert (Kapitel 6.2.1) und unverdünnt in die PCR eingesetzt. Die Überprüfung der Integration (Produkt S) und der mehrfachen Integration (Produkt M) erfolgte in separaten Ansätzen. Im Anschluss an die PCR erfolgte die Analyse der Ansätze mit Hilfe der Gelelektrophorese (Kapitel 6.2.3.2). Für die Amplifikation wurde die KOD-Polymerase (Novagen, Darmstadt) aus *Thermococcus kodakaraensis* sowie folgende Reaktionsansätze und unten stehendes Temperaturprofil verwendet:

Reaktionsansatz zum Nachweis der Integration:

10x KOD Hot Start DNA-Polymerase Puffer	2,5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	3 µl
dNTP-Mix (je 2mM; New England Biolabs, Ipswich, USA)	2,5 µl
Oligonukleotid P1 (10 pmol/µl)	1,5 µl
Oligonukleotid P2 (10 pmol/µl)	1,5 µl
KOD Hot Start DNA-Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl
DNA-Matrize	0,5 µl
H ₂ O	13 µl

Reaktionsansatz zum Nachweis einer multiplen Integration:

10x KOD Hot Start DNA-Polymerase Puffer	2,5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	3 µl
dNTP-Mix (je 2mM; New England Biolabs, Ipswich, USA)	2,5 µl
Oligonukleotid P3 (10 pmol/µl)	1,5 µl
Oligonukleotid P4 (10 pmol/µl)	1,5 µl
KOD Hot Start DNA-Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl
DNA-Matrize	0,5 µl
H ₂ O	13 µl

Temperaturprofil:

Denaturierung	95°C	5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 s	
<i>annealing</i>	67°C	30 s	
Amplifikation	72°C	2 min 40 s	
Restamplifikation	72°C	5 min	

6.1.1.2 Herstellung von Stämmen mit stabiler Integration von Plasmid-DNA in einfacher**Kopie**

Um eine vergleichbare Expression der *pGALL-HA3-CDH1*-Konstrukte für die Co-Immunpräzipitationsanalysen zu erreichen, wurden die DNA-Konstrukte mit Hilfe des Vektors pIS375 und eines speziellen Selektionsverfahrens (Sadowski *et al.*, 2007) als einzelne Kopie in das Genom des Hefestamms W1641 integriert. Zu diesem Zweck enthält der Vektor pIS375 eine Kopie des *URA3*-Gens sowie sogenannte *Yip-In*- und *Yip-Out*-Elemente, die komplementär zu den flankierenden Sequenzen des *MET15*-Gens im Hefegenom sind. Die *pGALL-HA3-CDH1*-Konstrukte wurden zwischen die *Yip-In*- und *Yip-Out*-Elemente eingesetzt, die nach Integration des Plasmids im Bereich des *MET15*-Genorts über das *Yip-In*-Element zur Bildung von duplizierten Sequenzen führen. Nach der Transformation der Hefezellen, welche gemäß der Beschreibungen in den Kapiteln 6.1.1 und 6.1.1.1 erfolgte, wurden die Zellen zunächst zur Selektion auf stabile Integration für 3 Tage bei 30°C auf Selektionsplatten ohne Uracil kultiviert. Die erhaltenen Transformanten wurden erneut auf Selektionsplatten

ohne Uracil ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf Vollmediumsplatten (Tabelle 8.9 im Anhang) ausgestrichen und für 4 Tage bei 25°C inkubiert, um in Abwesenheit von Selektionsdruck homologe Rekombination zwischen den *Yip-In*- und *Yip-Out*-Elementen zu erlauben. Die Kolonien wurden danach in zwei aufeinanderfolgenden Runden auf SC-Platten mit 1 mg/ml 5-Fluororotsäure (Zymo Research, Irvine, CA, USA) ausgestrichen, um auf Zellen zu selektieren, die das vom Plasmid stammende *URA3*-Gen auf Grund von Rekombination verloren haben. In Gegenwart eines intakten *URA3*-Gens wird 5-Fluororotsäure zu 5-Fluorouracil umgewandelt, das die Zellteilung hemmt und dadurch das Wachstum von Zellen mit intaktem *URA3*-Gen verhindert. Auf Grund der Anordnung der *Yip-In*- und *Yip-Out*-Elemente führen Rekombinationsereignisse entweder zu dem vollständigen Verlust des Plasmids oder zu einem Verlust des *URA3*-Gens bei gleichzeitiger Integration des *pGALL-HA3-CDH1*-Konstrukts als einzelne Kopie in das unterbrochene *MET15*-Gen. Transformanten mit einfacher Integration des *pGALL-HA3-CDH1*-Konstrukts wurden durch Replikaplattierung mit einem Metallstempel (siehe Kapitel 6.1.2.2) auf Selektionsplatten ohne Methionin und ohne Cystein identifiziert.

6.1.2 Herstellung von Hefestämmen durch gezielte Kreuzung und Sporulation

Alternativ zur Transformation wurden Hefestämme durch Kreuzung haploider Stämme generiert, welche eine Neukombination der DNA-Konstrukte aus den Ausgangsstämmen ermöglicht. In der Regel folgten anschließend die Sporulation der entstandenen, diploiden Zygote und eine Vereinzelnung der Sporen, um die neu kombinierten DNA-Konstrukte in haploiden Stämmen zu erhalten.

6.1.2.1 Kreuzung haploider Hefestämme

Um zwei haploide Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps miteinander zu kreuzen, wurde Zellmaterial der Stämme in sterilem Wasser resuspendiert und die Zellsuspension anschließend übereinander auf eine Vollmediumsplatte (Tabelle 8.9 im Anhang) getropft. Die Zellen wurden mindestens 8 h bei 30°C inkubiert. Sofern die Stämme verschiedene Selektionsmarker trugen, wurde Zellmaterial der gekreuzten Stämme zur Selektion auf diploide Zygoten auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausgestrichen.

6.1.2.2 Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse

Die Sporulation von diploiden Hefezellen und anschließende Tetradenanalyse wurde genutzt, um nach der Kreuzung von Hefestämmen wieder haploide Stämme zu generieren. Außerdem fand diese Methode in Komplementationsstudien Anwendung (Abb. 4.22 und 4.26 sowie Abb. 8.12 und 8.14 im Anhang). Um die Sporulation zu induzieren, wurden die

diploiden Zellen zunächst in 2 ml nährstoffreichem Prä-Sporulationsmedium in einem Glasröhrchen auf einem TC-7-Reagenzglasroller (New Brunswick Scientific GmbH, Nürnberg) entweder über Nacht bei 25°C oder für mindestens 8 h bei 30°C angezogen. Danach wurden die Zellen mit nährstoffarmen, Acetat-haltigem Sporulationsmedium gewaschen (2 min, 805 x g) und in 2 ml Sporulationsmedium in einem Glasröhrchen auf einem TC-7-Reagenzglasroller für drei Tage bei 25°C inkubiert.

Im Anschluss an die Sporulation wurden die durch meiotische Teilungen entstandenen, vier haploiden Sporen vereinzelt. Hierzu wurden 75 µl der sporulierten Zellen mit 75 µl Novozymlösung gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um den Ascus, der die Sporen als Hülle umschließt, zu öffnen. Zur Herstellung der Novozymlösung wurden 2 mg Novozym 234 (NovoBiolabs, Bagsvard, Dänemark) in einem Puffer aus 1 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH7.5, 1 mM EDTA und 50 mM DTT gelöst. Nach der Novozym-Behandlung wurden 15 µl der Zellsuspension in Form eines Streifens auf einer Vollmediumsplatte (Tabelle 8.9 im Anhang) aufgebracht. Die Sporen einer Tetrade wurden mit Hilfe eines Mikromanipulator MSM-Systems (MSM System Singer Instruments Co Ltd, Roadwater Somerset, Vereinigtes Königreich) aufgenommen und an Hand eines Rasters auf der Platte vereinzelt.

Von den haploiden Nachkommen wurde für die Tetradenanalyse der Genotyp der Sporen mittels Replikaplattierung auf entsprechenden Selektionsplatten bestimmt. Für die Replikaplattierung wurde jeweils 200 µl steriles Wasser in die Vertiefungen einer 96 Well-Mikrotiterplatte (Brand GmbH & Co KG, Wertheim) vorgelegt und Zellmaterial der Sporen, entsprechend dem Muster auf der Tetradenplatte, darin resuspendiert. Mit Hilfe eines Metallstempels mit 6 x 8 Metallstiften (DAN KAR Corporation, Wilmington, NJ, USA), die in einem passenden Abstand zu den Vertiefungen der Mikrotiterplatte angeordnet sind, wurden die Zellen auf die Selektionsplatten übertragen. Von ausgewählten Sporen wurde zudem der Paarungstyp mit einer PCR-basierten Methode überprüft (Huxley *et al.*, 1990). Dabei wurde eine Kombination von drei verschiedenen Oligonukleotiden eingesetzt (Tabelle 8.4 im Anhang), von denen zwei jeweils spezifisch im *MATa*- (WS828) oder *MATα*-Genort (WS827) und in unterschiedlichem Abstand zu dem dritten *primer* (WS826) binden, der für beide Oligonukleotide als Gegen-*primer* fungiert. Somit liefert die PCR-Amplifikation je nach Paarungstyp unterschiedlich lange Produkte (*MATa*: 544 bp; *MATα*: 404 bp), mit deren Hilfe der Paarungstyp der Sporen nach Gelelektrophorese (Kapitel 6.2.3.2) unterschieden werden kann. Für die PCR-Amplifikation wurde Zellmaterial der zu testenden Spore in folgendem Reaktionsansatz resuspendiert:

10x Kolonie-PCR-Puffer (125 mM Tris/HCl pH 8.5; 560 mM KCl)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (je 2mM; New England Biolabs, Ipswich, USA)	2,5 µl
Oligonukleotid-Mix (WS826, WS827, WS828; je 10 pmol/µl)	3 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
H ₂ O	15,2 µl

Als Polymerase für die Amplifikation diente die *Taq*-Polymerase (Biomaster GmbH, Windeck) aus *Thermus aquaticus*. Das Temperaturprofil für die Reaktion wurde wie folgt gewählt:

Denaturierung	94°C	4 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C	1 min	
<i>annealing</i>	55°C	1 min	
Amplifikation	72°C	40 s	
Restamplifikation	72°C	3 min	

6.1.3 Konservierung von Hefestämmen

Hergestellte Hefestämme wurden für bis zu 2 Monate auf Agarplatten bei 4°C gelagert. Für die dauerhafte Konservierung eines Stamms wurden Zellen in 3 ml Flüssigmedium über Nacht bei 25°C in einem Glasröhrchen auf einem TC-7-Reagenzglasroller (New Brunswick Scientific GmbH, Nürnberg) angezogen. Die Zellen wurden am nächsten Tag abzentrifugiert (2 min, 805 x g), in 1 ml 15%igem Glycerin resuspendiert und bei -70°C aufbewahrt.

6.2. Herstellung der DNA-Konstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-Vektoren sind Derivate der pRS- (Sikorski und Hieter, 1989), Ylplac- und YCplac- (Gietz und Sugino, 1988) oder pIS-Vektoren (Sadowski *et al.*, 2007) und sind in Tabelle 8.3 im Anhang aufgelistet. Gene, Gensegmente und regulatorische DNA-Bereiche wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*, Kapitel 6.2.2) von Plasmid-DNA oder genomischer DNA aus *S. cerevisiae* (Kapitel 6.2.1) amplifiziert und mit Schnittstellen für die anschließende Klonierung (Kapitel 6.2.3) versehen. Alternativ zur PCR-Amplifikation wurden DNA-Fragmente durch Restriktionsverdau aus bestehenden Plasmiden gewonnen und durch Klonierung in andere Plasmide umgesetzt. Gezielte Änderungen in der Sequenz von DNA-Konstrukten wurden mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese oder Gensynthese eingeführt (Kapitel 6.2.4).

Für die Herstellung von Fluoreszenzproteininfusionen fanden die Konstrukte *mCherry* (Shaner *et al.*, 2004) sowie dessen Codon-optimierte Version *yEmRFP* (Keppler-Ross *et al.*, 2008) und eine Codon-optimierte Version des *GFP*-Gens (Cormack *et al.*, 1997) Anwendung. Als Promotorsequenzen für eine regulierte Expression von DNA-Konstrukten dienten die *GAL1*-, *GALL*-, *MET3*- und *MET25*-Promotoren (Mumberg *et al.*, 1994; Yeong *et al.*, 2000). Für die konstitutive Expression von DNA-Konstrukten wurde der *TEF2*-Promotor aus *S. cerevisiae* verwendet, der die 445 Basenpaare vor dem ORF von *TEF2* umfasste. Als *CDC20*-Promotor dienten die 743 bp vor dem ORF von *CDC20*, während als *CDH1*-Promotor die 1263 bp vor dem ORF von *CDH1* verwendet wurden. Der *CYC1*- (Mumberg *et al.*, 1994) und der *ADH1*-Terminator (Longtine *et al.*, 1998) dienten als Terminatoren, sofern nicht die Region stromabwärts des Stopp-Codons der jeweiligen Gene als Terminator verwendet wurde.

Für die Expression des *SIC1-HA3*-Konstrukts von dem *SIC1*-Promotor wurde in parallelen Arbeiten in der AG Seufert das *SIC1*-Gen zusammen mit den 263 Basenpaaren vor dem ORF von *SIC1* amplifiziert. Für die Expression von *PDS1(1-175)-GFP* von dem *PDS1*-Promotor wurden die Codons 1-175 der *PDS1*-kodierenden Region zusammen mit den 1101 Basenpaaren vor dem ORF von *PDS1* amplifiziert. Die Herstellung der Aktivator-Chimären N20WD1 und N1WD20 sowie deren Derivate ist in einer früheren Arbeit beschrieben (Wegerer, 2004).

In dieser Arbeit wurden die Codons 614-663 des *SWI5*-Gens (Moll *et al.*, 1991) als Kernlokalisationssequenz (NLS, *nuclear localization sequence*) verwendet, wobei das Serin-Codon an Position 646 durch ein Alanin-Codon ersetzt war. Als Kernexportsignal (NES, *nuclear export signal*) fanden die Codons 441-518 des *NMD3*-Gens Anwendung (Gadal *et al.*, 2001).

6.2.1. Präparation von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Um Gene oder regulatorische Sequenzen aus *S. cerevisiae* mittels PCR amplifizieren zu können, wurde die genomische DNA aus *S. cerevisiae* Zellen isoliert. Der Zellaufschluss erfolgte dabei mechanisch durch Zerreiben der Zellen zwischen Glasperlen (Durchmesser 0,4 – 0,6 mm; Sartorius AG, Göttingen) in einer Schwingmühle MM200 oder MM2000 (Kurt Retsch GmbH, Haan). Die Glasperlen wurden im Vorfeld mit Salzsäure neutralisiert. Hierzu wurde eine Packung Glasperlen zweimal für 5 h mit 1 l Salzsäure (0,1 M) in einem 2 l-Erlenmeyerkolben geschüttelt. Zur Entfernung der Säure wurden die Glasperlen dreimal mit 1 l Tris/HCl-Puffer (pH 7.5) gewaschen.

Für die Isolierung der genomischen DNA wurden Zellen einer Übernachtskultur (3 ml) bei 805 x *g* abzentrifugiert, einmal mit Wasser gewaschen und schließlich in 100 µl Tris/EDTA/SDS-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5; 20 mM EDTA; 10 mg/ml SDS) aufgenommen. Es wurden 200 µl neutralisierte Glasperlen zu dem Ansatz gegeben und die Zellen in einer Schwingmühle durch Schütteln bei maximaler Frequenz für 5 min mechanisch aufgeschlossen. Um die Zellmembran und Proteine zu denaturieren und auszufällen, wurden zunächst weitere 500 µl des Tris/EDTA/SDS-Puffers zugegeben und die Zellen für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden dem Zellaufschluss 200 µl Kaliumacetat (5 M) zugesetzt, der Ansatz 10 min auf Eis gestellt und für 5 min bei 20800 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der DNA-enthaltene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur vollständigen Entfernung von Zellmaterial erneut zentrifugiert. Die Fällung der DNA erfolgte anschließend durch Zugabe von 1 ml Ethanol (100%) und mehrmaligem Invertieren. Die DNA wurde abzentrifugiert und nach Entfernen des Überstands für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Zur enzymatischen Entfernung von RNA wurde die DNA in 300 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5; 1 mM EDTA) gelöst und mit 5 µl RNase A-Lösung für 30 min bei 65°C inkubiert. Für die RNase A-Lösung wurden 10 mg/ml RNase A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in Tris/NaCl-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5; 15 mM NaCl) 15 min gekocht und langsam abgekühlt. Nach dem RNA-Verdau wurde der Ansatz durch Zugabe von 500 µl 100%

Isopropanol und mehrmaligem Invertieren gefällt, das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und die DNA für 1 h getrocknet. Um die isolierte DNA zu lösen, wurden 50 µl TE-Puffer zugegeben und die Lösung zunächst 1 h bei 65°C inkubiert und danach für mehrere Stunden bei Raumtemperatur invertiert.

6.2.2 Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels PCR für die Klonierung

Mit Hilfe der PCR-Methode (Mullis *et al.*, 1986) wurden Gene, Gensegmente und regulatorische DNA-Bereiche von genomischer DNA oder Plasmid-DNA amplifiziert. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide (eurofins Genomics GmbH/MWG-Biotech AG, Ebersberg) enthielten Restriktionsschnittstellen für die anschließende Klonierung. Als Polymerase diente die KOD-Polymerase (Novagen, Darmstadt) aus *Thermococcus kodakaraensis*, welche über eine Korrekturleseaktivität verfügt. Die verwendete *annealing*-Temperatur lag für eine spezifische Amplifikation 2°C über der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide (*primer*). Als DNA-Matrize dienten entweder 1 µl Plasmid-DNA (50 – 200 ng/µl) oder 1 µl einer 1:10 Verdünnung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*. Es wurden folgender Reaktionsansatz und folgendes Temperaturprofil verwendet:

Reaktionsansatz:

KOD Hot Start DNA-Polymerase Puffer (10x)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (je 2mM; New England Biolabs, Ipswich, USA)	5 µl
<i>forward primer</i> (10 pmol/µl)	3 µl
<i>reverse primer</i> (10 pmol/µl)	3 µl
KOD Hot Start DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
DNA-Matrize	1 µl
H ₂ O	26 µl

Temperaturprofil:

Denaturierung	94°C	5 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 s	
<i>annealing</i>	58 – 64°C	30 s	
Amplifikation	72°C	30 s / 600 bp	
Restamplifikation	72°C	5 min	

Im Anschluss an die PCR wurde das amplifizierte DNA-Fragment mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) gereinigt. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Der PCR-Erfolg wurde durch Gelelektrophorese überprüft (Kapitel 6.2.3.2). Alle PCR-amplifizierten Konstrukte wurden durch kommerzielle Sequenzierung überprüft (SeqLab Sequence Laboratories GmbH, Göttingen).

6.2.3 Klonierung

Mit Hilfe der Klonierung wurden DNA-Fragmente, die durch Restriktionsverdau aus Plasmid-DNA oder PCR-amplifizierter DNA gewonnen wurden, in Plasmid-Vektoren eingebracht und anschließend in *Escherichia coli* Zellen vervielfältigt. Zudem wurden mit dieser Methode DNA-Konstrukte neu kombiniert und in andere Vektoren, z. B. Expressionsvektoren, umgesetzt. Hierzu wurden die Ziel-DNA sowie das Vektormolekül mit Restriktionsenzymen geschnitten, durch Gelelektrophorese gereinigt und anschließend ligiert. Für die Vervielfältigung der hergestellten Plasmide wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α verwendet und die Plasmide nach Vermehrung in den DH5 α -Zellen (Genotyp: F-, ϕ 80dlacZ_M15_(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1) isoliert.

6.2.3.1 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, die an spezifische Sequenzmotive binden und das DNA-Molekül in definiertem Abstand zur Bindestelle durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung spalten. Die Restriktion von DNA erfolgte standardmäßig für 2 h und mit 10 U je Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 μ l, wobei sich die Inkubationstemperatur und der Reaktionspuffer nach den Herstellerangaben (NEB, Ipswich, USA) richteten. Die Isolierung und Reinigung der gewünschten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese (Kapitel 6.2.3.2).

6.2.3.2 Gelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese wurde genutzt, um DNA-Fragmente nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau zu analysieren und um DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau zu isolieren. Hierbei wurden die Fragmente auf Grund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats in einem Agarosegel im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Für die Herstellung der Gele wurden je nach Größe des aufzutrennenden Fragments 0,75 – 2 % Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 8.0; 1 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst und mit 0,2 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Agaroselösung wurde anschließend in eine dafür vorgesehene Form der verwendeten Gelapparaturen HE33 von Hoefer (San Francisco, USA) gegossen. Die DNA-Proben wurden für die Auftragung in die mit Hilfe eines Kamms ausgesparten Taschen mit Auftragspuffer (10x Stammlösung: 10 mM Tris/HCl pH 7.8; 1 mM EDTA; 2,5 mg/ml Bromphenolblau; 300 mg/ml Glycerin) versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer Stromspannung von 80 V. Die DNA-Fragmente wurden im Anschluss mit Hilfe des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht und gegebenenfalls fotografiert. Für die Größenbestimmung der Fragmente wurde der GeneRulerTM DNA Längenstandard von Fermentas International Inc. (Burlington, Canada) als Referenz aufgetragen.

Um DNA-Fragmente nach der Gelelektrophorese zu isolieren und zu reinigen, wurden die Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert.

6.2.3.3 Ligation von DNA-Molekülen

Um die durch Restriktionsverdau (Kapitel 6.2.3.1) generierten, linearen DNA-Fragmente von Vektor und Insert zu ligieren, wurde die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet, welche die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat-Enden und 3'-Hydroxy-Enden von doppelsträngiger DNA katalysiert. Die Konzentrationen der DNA-Fragmente wurden an Hand der Intensität des Ethidiumbromid-Signals in der Gelelektrophorese abgeschätzt und das Insert in 5-fachem Überschuss zu 50 – 100 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Ligase-Reaktion fand standardmäßig für 2 h bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von 20 µl statt, wobei 1 U der T4-DNA-Ligase sowie 2 µl des mitgelieferten Reaktionspuffers verwendet wurde.

6.2.3.4 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden diese mittels Elektroporation in Zellen des *Escherichia coli*-Stamms DH5α eingebracht. Im Vorfeld wurden die DH5α-Zellen für die Elektroporation kompetent gemacht. Hierzu wurden 750 ml TB-Medium (Tabelle 8.8 im Anhang) mit 40 OD₆₀₀ (ca. 4×10^9) Zellen aus einer Übernachtskultur angeimpft und für 20 h bei 25°C geschüttelt. Die Kultur wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀/ml von 1 (entspricht 1×10^8 DH5α-Zellen/ml) auf Eis abgekühlt und durch 15 min Zentrifugieren bei 4°C und 1522 x g geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit 150 ml kaltem, sterilem Wasser gewaschen, in 70 ml 10% Glycerin resuspendiert und 15 min bei 3220 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden final in 2 ml 10% Glycerin aufgenommen und als 100 µl-Aliquots auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurden die elektrokompenten DH5α-Zellen auf Eis aufgetaut und mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. Je Ansatz wurden 100 µl verdünnte Zellen mit 0,5 µl gereinigtem Plasmid oder 5 µl Ligationsansatz, der zuvor mit Hilfe einer Dialysemembran (Porengröße 0,025 µm, Millipore GmbH, Schwalbach) gegen destilliertes Wasser für 20 min dialysiert wurde, gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (PepLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit der Elektroporationsapparatur EP2510 (Eppendorf AG, Hamburg) bei einer Kondensatorspannung von 2500 V, einer Feldstärke von 12,5 kV/cm, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium (Tabelle 8.8 im Anhang) aufgenommen und zur Selektion auf positive Transformanten auf LB-Platten (Tabelle 8.8 im Anhang) mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.3.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Für die Isolierung von Plasmiden nach ihrer Vervielfältigung in DH5 α -Zellen fanden entweder die Kochlysate-Methode (Berghammer und Auer, 1993) oder kommerzielle Säulenreinigungssysteme Anwendung.

Mit Hilfe der Kochlysate-Methode wurden transformierte DH5 α -Zellen auf die Aufnahme des gewünschten Plasmids getestet. Hierzu wurden Zellen der Transformanten in 3 ml LB-Medium (Tabelle 8.8 im Anhang), das mit 100 μ g/ml Ampicillin versetzt wurde (LB-Amp), über Nacht bei 37°C in Glasröhrchen auf einem TC-7-Reagenzglasroller (New Brunswick Scientific GmbH, Nürnberg) angezogen. Von der Übernachtskultur wurden 2 ml in einem Reaktionsgefäß 3 min bei 16100 x *g* zentrifugiert und die Zellen nach Entfernen des Überstands in 40 μ l EasyPrep-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0; 1 mM EDTA; 15% Saccharose (w/v); 2 mg/ml Lysozym (Fluka, Deisenhofen); 0,2 mg/ml RNase A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim); 0,1 mg/ml BSA) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 100°C im Heizblock inkubiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zentrifugieren für 15 min bei 16100 x *g* wurde die im Überstand befindliche Plasmid-DNA mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese analysiert. Auf Grund von Protein- und RNA-Verunreinigungen eignete sich diese Art der Plasmid-Präparation nicht für die Aufbewahrung oder Sequenzierung.

Zur Isolierung von gereinigter Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurden die DH5 α -Zellen über Nacht in 3 ml LB-Amp-Medium bei 37°C angezogen (siehe oben) und die Plasmid-DNA mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Mini Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren) isoliert. Zur Isolierung von Plasmid-DNA im größeren Maßstab wurden die Zellen in 80 ml LB-Amp-Medium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Hilfe eines Aquatron-Schüttelwasserbads (Infors AG, Einsbach) über Nacht bei 37°C angezogen und die Plasmide mit dem GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) isoliert. In beiden Fällen wurde nach Herstellerangaben verfahren. Lediglich bei der Verwendung des GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kits wurde abweichend vom Standardprotokoll des Herstellers die Säule nach dem letzten Waschschrift (Waschlösung 2) trocken zentrifugiert (2 min, 3000 x *g*), um Ethanolrückstände zu entfernen. Anschließend wurde die Säule für die Elution der DNA 2 min mit 500 μ l des Elutionspuffer inkubiert und 5 min bei 3000 x *g* zentrifugiert.

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten Plasmid-DNA erfolgte durch die Messung der Extinktion bei 260 nm unter Verwendung des BioPhotometers und einer zugehörigen UV-durchlässigen Küvette (Eppendorf AG, Hamburg). Der Quotient aus den Messungen der Extinktion bei 260 nm und 280 nm war dabei ein Maß für die Reinheit der DNA-Lösung.

6.2.4 Gezielte Manipulation von Gensequenzen

Für die Einführung von gezielten Mutationen in Gensequenzen wurden verschiedene Herangehensweisen verfolgt. Um die m(4-9)D-Mutation in *CDH1* einzufügen, wurde mittels kommerzieller Gensynthese (eurofins Genomics GmbH, Ebersberg) ein *CDH1*-Fragment (Basenpaare 211-854) hergestellt, in welchem die Serin- und Threonin-Codons 157, 169, 173,

176, 227 und 239 durch Aspartat-Codons ersetzt sind. Dieses *CDH1*-Fragment wurde mit Hilfe interner Restriktionsschnittstellen in die verschiedenen *CDH1*-Konstrukte eingebracht. Das *cdc20ΔIR*-Konstrukt entstand durch Amplifikation des *CDC20*-Gens ohne die letzten beiden Codons (hergestellt in einer früheren Arbeit der AG Seufert).

Alle weiteren Mutationen wurden mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese in die Gensequenzen eingeführt (Braman *et al.*, 1996). Hierzu wurde ein Plasmid, das die entsprechende Gensequenz trägt, *in vitro* mit speziell gestalteten Oligonukleotiden amplifiziert, welche die einzuführende Mutation tragen und ansonsten komplementär zu den Sequenzbereichen vor und nach dem Ort der Mutation sind. Die Länge der Oligonukleotide wurde dabei so gewählt, dass die Schmelztemperatur der umgebenden Sequenzen vor und nach der Mutation jeweils 58°C beträgt. In dieser Arbeit wurde für die Mutagenese ein komplementäres Paar von Oligonukleotiden verwendet, die in Tabelle 8.5 im Anhang aufgeführt sind. Die Amplifikation führt zu einem Gemisch aus dem ursprünglichen Plasmid und dem *in vitro* synthetisierten Plasmid, das die Oligonukleotide einschließlich der Mutation trägt. Als Polymerase für die Amplifikation diente die KOD-Polymerase (Novagen, Darmstadt) aus *Thermococcus kodakaraensis*, welche über eine Korrekturleseaktivität verfügt. Es wurden 50 ng von dem zu mutierenden Plasmid eingesetzt und die Amplifikation erfolgte mit folgendem Reaktionsansatz und Temperaturprofil:

Reaktionsansatz:

KOD Hot Start DNA-Polymerase Puffer (10x)	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (je 2mM; New England Biolabs, Ipswich, USA)	5 µl
Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl)	3 µl
Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl)	3 µl
KOD Hot Start DNA-Polymerase (1 U/µl)	1,5 µl
DNA-Matrize	1 µl
H ₂ O	25,5 µl

Temperaturprofil:

Denaturierung	94°C	4 min	} 22 Zyklen
Denaturierung	94°C	1 min	
<i>annealing</i>	58 – 64°C	1 min	
Amplifikation	72°C	30 s / 600 bp	
Restamplifikation	72°C	5 min	

Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte die Entfernung des ursprünglichen Plasmids aus dem Reaktionsansatz durch Zugabe des Restriktionsenzym DpnI (New England Biolabs, Ipswich, USA), das spezifisch methylierte DNA und daher nur das ursprüngliche, aus *E. coli* isolierte Plasmid, aber nicht das *in vitro* synthetisierte Plasmid schneidet. Es wurden 1,5 µl DpnI und 5,5 µl des mitgelieferten Reaktionspuffers direkt zum Ansatz gegeben und mindestens 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz gegen destilliertes

Wasser dialysiert, für die Transformation von elektrokompetenten DH5 α -Zellen wie beschrieben verwendet (Kapitel 6.2.3.4) und die Mutations-Plasmide nach Vermehrung in den DH5 α -Zellen isoliert (Kapitel 6.2.3.5).

Die m(1-3)D-Mutation wurde in *CDH1* durch Austausch der Threonin- und Serin-Codons an den Positionen 12, 16 und 42 durch Aspartat-Codons eingeführt. Für die Inaktivierung der vorhergesagten NLS-Sequenz in der NTD von Cdh1 (NLSm) wurden die Lysin- und Arginin-Codons in der vorhergesagten Sequenz (Abb. 4.4 A) zu Alanin-Codons verändert. Die Mutation der vorhergesagten NES für Crm1-abhängigen Export (Abb. 8.15 im Anhang) erfolgte durch Austausch der Isoleucin- und Valin-Codons an den Positionen 69, 70 und 72 durch Serin-Codons (pNESm). Zur Inaktivierung der RxxL-Motive in Cdc20 wurden die Arginin- und Leucin-Codons an den Positionen 17 und 20 (rxxl1) sowie 60 und 63 (rxxl2) durch Alanin-Codons ersetzt. Für die Mutation der putativen Cdk-Phosphorylierungsstelle im Bereich des RxxL1-Motivs von Cdc20 wurde das Serin-Codon an Position 24 entweder durch ein Alanin- (S24A) oder ein Aspartat-Codon (S24D) ersetzt. Die Mutationen T449Q, Y492N und R540K in der WD40-Domäne von Cdh1 wurden durch Austausch der Aminosäure-Codons an den jeweiligen Positionen durch die entsprechenden Aminosäure-Codons durchgeführt. Die Mutationen T449I und R540L aus dem WD40-Spezifitäts-Screen (Kapitel 6.8) wurden durch Klonierung unter Verwendung einer internen BamHI-Schnittstelle getrennt. Die Mutation des KEN-Motivs und RxxL-Motivs in Pds1 erfolgte durch Austausch der Codons 8-10 (ken) bzw. der Codons 85 und 88 (rxxl) durch Alanin-Codons.

Die Serin- und Threonin-Codons der Cdk-Phosphorylierungsstellen in *CDH1* wurden in einer früheren Arbeit zu Alanin-Codons verändert (Zachariae *et al.*, 1998) und Plasmide mit den mutierten *CDH1*-Allelen dienten als Matrize zur Herstellung der verkürzten *CDH1*-Versionen mittels PCR. Die Deletion der für die C-Box codierenden Region (Δ CB) in *CDH1* wurde ebenfalls in einer früheren Arbeit hergestellt (Schwab *et al.*, 2001). Die Deletion der für die C-Box codierenden Region in *CDC20* erfolgte durch den Austausch der Codons 144-150 durch ein Serin- und ein Isoleucin-Codon (in einer früheren Arbeit der AG Seufert). Die Herstellung des stabilen Clb2-Derivats clb2- Δ db durch Deletion der D-Box-Sequenz wurde an anderer Stelle beschrieben (Schwab *et al.*, 1997).

6.3 Kultivierung und Synchronisation von Hefekulturen in Flüssigmedium

Die Kultivierung von Hefezellen erfolgte mit Ausnahme von *pMET3-CDC20*-Stämmen (siehe unten) in XY-Vollmedium (Tabelle 8.9 im Anhang), welches je nach Verwendung mit 2% Glukose (XYD), Galaktose (XYG) oder Raffinose (XYR) versetzt wurde. Vor einem Experiment wurden die Stämme grundsätzlich über Tag (mindestens 8 h) in einem Volumen von 5 ml in Glasröhrchen auf einem TC-7-Reagenzglasroller (New Brunswick Scientific GmbH, Nürnberg) bei 30°C angezogen. Mit Hilfe dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur für das Experiment mit einer definierten Zellmenge angeimpft und über Nacht bei 25°C bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte am nächsten Tag inkubiert. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) mit Hilfe eines Ultrospec III

Spektrophotometers (LKB Pharmacia AG, Freiburg). Dabei entspricht 1 OD₆₀₀ Zellen in etwa 1×10^7 Hefezellen. Die Hauptkulturen wurden je nach Volumen in Glasröhrchen oder in einem Erlenmeyerkolben geeigneter Größe (100 ml-Kolben bis zu einem Kulturvolumen von 20 ml; 500 ml-Kolben bis zu einem Kulturvolumen von 250 ml) kultiviert. Die Glaskolben wurden in einem Aquatron Schüttelwasserbad (Infors AG, Einsbach) bei 160 rpm geschüttelt.

Um die Expression der *GFP-CDH1*-Konstrukte von dem *MET25*-Promotor zu induzieren, wurden die Zellen zunächst in XYD-Vollmedium angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (2 min, 805 x g), in synthetischem Medium ohne Methionin (Tabelle 8.9 im Anhang) gewaschen (2 min, 805 x g) und anschließend für 45 min in synthetischem Medium ohne Methionin bei 25°C kultiviert. Stämme, in denen die Expression von *CDC20* unter Kontrolle des *MET3*-Promotors stand (*pMET3-HA3-CDC20*), wurden grundsätzlich in synthetischem Medium ohne Methionin kultiviert. Sofern diese Zellen mit Derivaten des ARS/CEN-Plasmids YCplac33 transformiert worden waren, wurden die Zellen in synthetischem Medium ohne Methionin und ohne Uracil kultiviert. Um die Expression von Konstrukten von dem *GAL1*- oder *GALL*-Promotor zu induzieren, wurden die Zellen zunächst in Vollmedium mit Raffinose (XYR) angezogen und anschließend wurde 2% Galaktose zu den exponentiell wachsenden Kulturen gegeben. Die Induktion mit Galaktose erfolgte standardmäßig bei einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,3 – 0,45/ml (entspricht ca. $3 - 4,5 \times 10^6$ Hefezellen/ml) für 2 h bei 25°C. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde die Expression lediglich 1 h induziert. Für das Abschalten des *GAL1*-Promotors im Rahmen der Stabilitätsmessungen der Cdc20(1-80)-GFP-Derivate (Abb. 4.14 – 4.16) wurden die Zellen nach der zweistündigen Galaktose-Induktion geerntet (2 min, 805 x g) und anschließend in Glukose-haltigem Medium (XYD) aufgenommen und bei 25°C weiter kultiviert.

Um *MATa*-Zellen in der G1-Phase zu arretieren, wurde das Paarungspheromon α -Faktor verwendet. Hierzu wurden exponentiell wachsende *MATa*-Zellen mit 50 ng/ml α -Faktor (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Stammlösung 500 µg/ml in H₂O) versetzt und für 3 h bei 25°C inkubiert. Hierbei wurden Stämme verwendet, denen das *BAR1*-Gen durch Deletion entfernt wurde, um eine Spaltung des α -Faktors durch die Bar1-Protease zu verhindern. Um Zellen durch einen G1-Arrest synchron in den Zellzyklus zu entlassen, wurden die Zellen lediglich für 2 h mit α -Faktor arretiert. Anschließend wurden die Zellen mit Pheromon-freiem Medium gewaschen (2 min, 805 x g) und in Pheromon-freiem Medium bei 25°C weiter inkubiert. Für einen Arrest in der nächsten G1-Phase wurde 70 min nach Entlassen der Zellen aus dem G1-Arrest erneut α -Faktor zugegeben. Für die Synchronisation von Zellen vor Beginn der Anaphase wurde das Spindelgift Nocodazol (AppliChem GmbH, Darmstadt) verwendet, das eine Depolymerisation der Mikrotubuli bewirkt und dadurch das Spindelkontrollsystem aktiviert. Zu diesem Zweck wurden 7,5 µg/ml Nocodazol (Stammlösung: 1,5 mg/ml in DMSO) zu exponentiell wachsenden Zellen gegeben und die Zellen anschließend für 3 h bei 25°C kultiviert. Sowohl der G1-Arrest durch α -Faktor als auch der Arrest durch Nocodazol wurde an Hand der Zellmorphologie mit Hilfe eines Olympus CH2 Mikroskops (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) überprüft.

6.4 Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen

6.4.1 Präparation und Mikroskopie der Zellen

Um die Lokalisation oder Stabilität von Proteinen, die mit den Fluoreszenzproteinen GFP, mCherry oder mRFP markiert waren, in lebenden Hefezellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen, wurden exponentiell wachsende Zellen durch Zentrifugation (2 min, 805 x *g*) geerntet und das überstehende Medium durch Dekantieren entfernt. Der zurückbleibende Mediumsrest wurde genutzt, um Zellen von der Oberfläche des Pellets durch Schwenken zu resuspendieren. Davon wurden 3 µl Zellen auf ein Deckglas (24 x 60 mm, Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH und Co KG, Braunschweig) aufgetropft und mit einem Agar-Blöckchen abgedeckt und gleichzeitig verteilt. Die Oberseite des Agar-Blöckchens wurde mit einem weiteren Deckglas (VWR International GmbH, Ismaning) abgedeckt. Für die Mikroskopie von Konstrukten, die von dem *GAL1*-Promotor exprimiert wurden, wurde Galaktose-haltiger Agar und in allen anderen Fällen Glukose-haltiger Agar mit folgenden Zusammensetzungen verwendet:

Zusammensetzung des Glukose-Agars:

0,75% Agarose in H ₂ O	10,5 ml
20% Glukose in H ₂ O	1,5 ml
10x YNB-Lösung (Tabelle 8.10 im Anhang)	1,5 ml
10x Dropout ++ (Tabelle 8.10 im Anhang)	1,5 ml

Zusammensetzung des Galaktose-Agars:

1% Agarose in H ₂ O	8,25 ml
20% Galaktose in H ₂ O	0,75 ml
10% Raffinose in H ₂ O	3,0 ml
10x YNB-Lösung (Tabelle 8.10 im Anhang)	1,5 ml
10x Dropout ++ (Tabelle 8.10 im Anhang)	1,5 ml

Für die Herstellung des Agars wurde die durch Erhitzen gelöste Agarose mit den oben beschriebenen Bestandteilen des Agars gemischt und in eine Petrischale gegossen. Aus dem erkalteten Agar wurden mit Hilfe eines Skalpells ca. 15 x 15 mm große Blöcke geschnitten.

Die Zellen wurden unter Verwendung eines Plan-Apochromat-Objektivs (63x/1.40 Oil DIC) an einem Observer Z.1 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) bei 20 – 22°C aufgenommen, das mit einer konfokalen CSU-X1 Spinning-Disk-Einheit (Yokogawa Electric Corporation, Tokyo, Japan) und einer AxioCam MRM Kamera (1388 x 1040 Pixel, Carl Zeiss) ausgestattet war. Die Anregung von GFP erfolgte mit einem OPSSL-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm und die Anregung von mCherry und mRFP mit einem Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 561 nm. Es wurden grundsätzlich Z-Stapel bestehend aus 10 Z-Ebenen mit einem Abstand von 0,5 µm bei einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Für Zeitrafferaufnahmen erfolgte die Aufnahme von Z-Stapeln in einem Intervall von 5 min für einen Zeitraum von 2 h. Als Software diente Axio Vision LE Rel. 4.8 von Zeiss.

6.4.2 Bildbearbeitung und Quantifizierung der Mikroskopie-Daten

Die Bildbearbeitung und die Quantifizierung der Mikroskopie-Daten wurden mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) durchgeführt. Um Einzel- oder Zeitrafferaufnahmen für Abbildungen zusammenzustellen, wurden die Ebenen eines Z-Stapels auf eine Ebene projiziert (Makros 8.1 und 8.2 im Anhang). Dabei wurde für jeden Pixel entweder der Durchschnittswert (Durchlichtkanal) oder der maximale Wert (Fluoreszenzkanäle) aus allen Ebenen verwendet. Der Kontrast wurde mit der Einstellung „min/max“ eingestellt und die Kontrastverstärkung erfolgte mit einer Sättigung von 0,01 Pixeln. Für die Zusammenstellung wurde in jedem Kanal ein identischer Bildausschnitt dupliziert und nach Überlagerung der Fluoreszenzkanäle wurden die Einzelbilder mit der *stack combiner*-Funktion von ImageJ zusammengefügt.

Um die Änderungen des Kernsignals für die Cdh1-GFP-Derivate quantitativ zu erfassen (Abb. 4.2 – 4.7), wurde das GFP-Signal in nicht-projizierten Fluoreszenzkanälen mit Hilfe des *3D manager plugin* quantifiziert (Ollion *et al.*, 2013). Dabei wurde mit Hilfe des Co-Markers Kern-Cherry der Bereich des Kernsignals festgelegt, um ausschließlich nukleäre Signalanteile zu quantifizieren. Zunächst wurde in beiden Fluoreszenzkanälen ein identischer Bereich, der keine Zellen oder Fluoreszenzsignale enthielt, ausgewählt und für die Subtraktion des Hintergrundsignals verwendet. Die Hintergrundsubtraktion erfolgte mit dem *background subtraction from ROI*-Befehl des *ROI plugin (regions of interest)*, wobei Null als Wert für die Standardabweichung eingestellt wurde. Anschließend wurde in beiden Kanälen ein identischer Bildausschnitt mit der zu analysierenden Zelle festgelegt und als *hyperstack*, bestehend aus Z-Ebenen und Zeitwerten, dupliziert. Die duplizierten *hyperstacks* der Kanäle wurden in die einzelnen Zeitwerte geteilt und die entstandenen Z-Stapel wurden anschließend als Zeitreihe zu einem kombinierten Z-Stapel in vertikaler Anordnung zusammengefügt. Um die Kernsignale automatisiert zu erfassen und als Koordinaten bzw. ROIs in den 3D-Manager zu laden, wurde erst ein Medianfilter (Radius 3.0) und anschließend die automatische Schwellenwert-Einstellung (*threshold*) „MaxEntropy“ auf den kombinierten Z-Stapel des Kern-Cherry-Markers angewendet. Mit Hilfe des *3D segmentation*-Befehls des 3D-Managers wurden die Kernsignale über die Z-Ebenen hinweg erfasst und als ROI festgelegt. Nachdem die Koordinaten der ROIs durch den Befehl *Add Image* in den 3D-Manager geladen wurden, wurden die ROIs auf den kombinierten Z-Stapel des GFP-Kanals übertragen. Die Signalintensität innerhalb der ROIs wurde mit Hilfe des *Quantify 3D*-Befehls quantifiziert und die Messwerte in der Ergebnistabelle an Hand der Y-Koordinate sortiert.

Da sich die subzelluläre Verteilung von Cdc20(1-80)-GFP sowie den abgeleiteten S24A- und S24D-Mutanten nicht im Zellzyklus änderte, erfolgte die Quantifizierung ihrer GFP-Signale in 2D-Projektionen der aufgenommenen Z-Stapel-Zeitserie. Hierzu wurde die Projektionsmethode *sum slices* verwendet, mit deren Hilfe die Werte aus allen Ebenen für jeden Pixel eines Z-Stapels summiert wurden. Anschließend wurde in beiden Fluoreszenzkanälen ein identischer Bereich, der weder Zellen noch Fluoreszenzsignale enthielt, für die Hintergrundsubtraktion ausgewählt, die mit dem *background subtraction from ROI*-Befehl des *ROI plugin* durchgeführt wurde (mit dem Wert Null als Einstellung für

die Standardabweichung). Für die Quantifizierung wurde für die jeweilige Zelle ein identischer Bildausschnitt in beiden Fluoreszenzkanälen gewählt und dupliziert. Die duplizierte Zeitserie wurde für jeden Kanal in die einzelnen Zeitwerte geteilt und die resultierenden Einzelbilder zu einer vertikalen Zeitreihe kombiniert. Die Festlegung des zu quantifizierenden Bereichs erfolgte mit Hilfe des Signals von Kern-Cherry. Um das Kernsignal zu erfassen, wurde in dem Cherry-Kanal der Schwellenwert (*threshold*) „MaxEntropy“ gesetzt. Anschließend wurden über den Befehl *analyze particles* (minimale Partikelgröße: 50 Pixel²; Zirkularität: 0 – 1; *add to manager*: aktiv) die Koordinaten der Kernsignale in den ROI-Manager geladen. Die ROIs wurden in den GFP-Kanal übertragen und die Signalintensität der ROIs über den *measure*-Befehl des ROI-Managers quantifiziert.

Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mit Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) und die graphische Darstellung mit GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Im Fall der Cdh1-GFP-Derivate wurde als Beginn des Kernimports der Zeitpunkt festgelegt, an welchem das nukleäre GFP-Signal um mindestens 10% im Vergleich zum vorangegangenen Wert zunahm. Dabei wurde nach der Kerntrennung die Signalintensität von Mutter- und Tochterzellkern summiert. Als Zeitpunkt für den Beginn des Kernexports wurde der Zeitwert definiert, an dem das nukleäre GFP-Signal der Zelle um mehr als 10% im Vergleich zum vorangegangenen Wert abnahm. Im Fall der Abbaukurven für die Cdc20(1-80)-GFP-Derivate wurde der Zeitwert als Abbaubeginn festgelegt, an welchem das Signal um mindestens 5% im Vergleich zum vorangegangenen Wert abnahm und danach für mindestens drei aufeinanderfolgende Zeitwerte nicht wieder anstieg.

6.5. Proteinanalytische Methoden

6.5.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden exponentiell wachsende Zellen durch Zentrifugieren geerntet (2 min, 805 x g) und einmal mit eiskaltem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem Aufschlusspuffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7.5; 5 mM EDTA; 0,1% IGEPAL CA-360; 50 mM NaF; 60 mM β -Glycerolphosphat) resuspendiert, wobei in etwa 10 μ l Puffer pro 1 OD₆₀₀ Zellen (ca. 1×10^7 Zellen) verwendet wurden. Für den Vergleich der Expression der verkürzten Cdh1-GFP-Derivate (Abb. 8.2 im Anhang) wurde ein Aufschlusspuffer ohne NaF und β -Glycerolphosphat verwendet. Zu der Zellsuspension wurden neutralisierte Glasperlen (siehe Kapitel 6.2.1) in gleichem Volumen zugegeben und der Ansatz für den mechanischen Zellaufschluss für 5 min in einer Schwingmühle MM200 oder MM2000 (Kurt Retsch GmbH, Haan) bei maximaler Frequenz geschüttelt. Nach dem Aufschluss wurden die Zellfragmente durch Zentrifugieren (3 min, 20800 x g) bei 4°C entfernt.

Für die Proteinbestimmung wurden 5 μ l des Überstands 1:1000 in Wasser verdünnt und anschließend 1:1 mit 500 μ l Bradford-Lösung (Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) 1:5 in H₂O) gemischt. Nach 7 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde

für die Bestimmung des Proteingehalts die Extinktion bei 595 nm mit Hilfe eines Ultrospec III Spektrophotometers (LKB Pharmacia AG, Freiburg) gemessen. Als Referenz wurden 500 µl Bradford-Lösung mit 500 µl H₂O gemischt.

Parallel wurde für die Westernblot-Analyse 25 – 50 µl Überstand mit dem gleichen Volumen 2x Lämmli-Puffer (120 mM Tris/HCl pH 6.8; 40 mg/ml SDS; 200 mg/ml Glycerin; 400 µg/ml Bromphenolblau; 10% β-Mercaptoethanol) gemischt und für 10 min bei 100°C erhitzt. Die Proben wurden bis zur Westernblot-Analyse (Kapitel 6.5.2) bei -20°C aufbewahrt. Von Gesamtzellextrakten wurden je nach Expression des untersuchten Konstrukts 1 – 4 OD₅₉₅ aufgetragen.

6.5.2 Co-Immunpräzipitation

Um die Interaktion von Cdh1-Derivaten mit dem APC/C *in vivo* mittels Co-Immunpräzipitation (CoIP) zu untersuchen, wurden Gesamtzellextrakte (Kapitel 6.5.1) von exponentiell wachsenden Zellen hergestellt, die Epitop-markierte Versionen von *CDC23* und den *CDH1*-Derivaten exprimierten. Für die CoIP wurden die Zelllysate nach dem Aufschluss in der Schwingmühle erst 10 min bei 4°C zentrifugiert (20800 x *g*) und nach Überführen des Überstands in ein frisches Reaktionsgefäß erneut 15 min zentrifugiert, um störende Lipide und Zellbestandteile vollständig zu entfernen. Nach Bestimmung des relativen Proteingehalts wurden identische Mengen Gesamtprotein (150 OD₅₉₅) eingesetzt und das Volumen auf 500 µl mit Aufschlusspuffer aufgefüllt. Für eine Präzipitation über das HA3-Epitop wurde jeder Ansatz mit 100 µl des monoklonalen Anti-HA-Antikörpers 12CA5 versetzt (Field *et al.*, 1988). Für eine Präzipitation über das Myc3-Epitop (Abb. 8.5 im Anhang) wurden 2 µl des monoklonalen Anti-Myc-Antikörpers 9E10 (gereinigt) eingesetzt (Evan *et al.*, 1985). Die Ansätze wurden für 2 h bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Für die anschließende Präzipitation der gebildeten Immunkomplexe wurden zu jedem Ansatz 40 µl Protein A-Agarose (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) gegeben, die zuvor zweimal mit 500 µl Aufschlusspuffer gewaschen wurde. Nach Zugabe der Protein A-Agarose wurden die Ansätze weitere 2 h bei 4°C auf dem Roller inkubiert. Im Anschluss wurden die Immunpräzipitate dreimal mit je 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen und der Puffer mit Hilfe einer Hamiltonspritze vollständig entfernt. Die Präzipitate wurden in 40 µl 1,5 x LSB (90 mM Tris/HCl pH 6.8; 30 mg/ml SDS; 150 mg/ml Glycerin; 300 µg/ml Bromphenolblau; 7,5% β-Mercaptoethanol) aufgenommen und für 10 min bei 100°C inkubiert. Die Ansätze wurden bis zur Westernblot-Analyse (Kapitel 6.5.3) bei -20°C aufbewahrt. Für den Nachweis von immunpräzipitierten Cdh1-Derivaten wurden 1,33 µl des Immunpräzipitats (entspricht 5 OD₅₉₅ Protein) und für den Nachweis von co-präzipitiertem Cdc23 wurden 10,67 µl des Immunpräzipitats (entspricht 40 OD₅₉₅ Protein) in die Westernblot-Analyse eingesetzt.

6.5.3 Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Für den Nachweis in der Westernblot-Analyse wurden die Proteine im Vorfeld mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das verwendete System war die Gelapparatur Minigel Twin G42 (Biometra GmbH, Göttingen). Für die Auftrennung wurden Gele aus Trenn- und Sammelgel mit diskontinuierlichem Puffersystem mit folgenden Zusammensetzungen verwendet:

Trenngel:

H ₂ O	2,6 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8.8	1,5 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (37,5:1)	1,8 ml
10% Natriumdodecylsulfat (SDS)	60 µl
10% Ammoniumpersulfat	36,5 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	3,65 µl

Sammelgel:

H ₂ O	1,5 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6.8	625 µl
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (37,5:1)	335 µl
10% Natriumdodecylsulfat (SDS)	25 µl
10% Ammoniumpersulfat	25 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	2,5 µl

Das zwischen die Glasplatten gegossene Trenngel wurde mit 200 µl Isopropanol überschichtet, der vor dem Einfüllen des Sammelgels mit destilliertem Wasser ausgewaschen wurde. Zur Aussparung der Probestaschen im Sammelgel wurde standardmäßig ein Kamm mit 16 Zähnen gewählt. Die Auftrennung erfolgte mit Lämmli-Laufpuffer (25 mM Tris Base; 946 mM Glycin; 10 g/l SDS) bei 17 mA pro Gel je nach Größe des nachzuweisenden Proteins für 110 – 135 min. Als Größenstandard diente der ColorPlus Marker (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA, USA).

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe der Elektrophoret-Apparatur Semi-Dry SEDEC M (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen) auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel) übertragen. Hierzu wurde ein Whatman GB005 Papier (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel) in Transferpuffer (2,9 g/l Glycin; 5,8 g/l Tris Base; 37 ml/l 10% SDS; 100 ml/l Methanol) getränkt und auf die Graphitelektrode (Anode) der Elektrophoret-Apparatur gelegt. Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst in H₂O hydratisiert und nach Tränken in Transferpuffer auf dem Whatman-Papier platziert. Anschließend wurde das Trenngel vom Sammelgel abgeschnitten, in Transferpuffer getaucht und luftblasenfrei auf die Nitrocellulose-Membran gelegt. Das Gel wurde mit einem mit Transferpuffer getränkten Whatman-Papier abgedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 40 mA pro Gel für 90 min. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran reversibel mit PonceauS-Lösung (1 g/l PonceauS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); 50 ml/l Eisessig) gefärbt. Um unbesetzte Bindestellen auf der Membran zu

blockieren, wurde die Membran mit einer Lösung aus 5% Milchpulver in TBS-T (20 mM Tris Base pH 7.6; 137 mM NaCl; 0,1% Tween 20) für mindestens 30 min inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf einer Wippe. Nach dreimaligem Waschen des Blots mit jeweils 10 ml TBS-T wurde die Membran für 2 h mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Vor der Detektion wurde die Membran erneut dreimal mit jeweils 10 ml TBS-T gewaschen. Alle Antikörper wurden in TBS-T-Milchpulverlösung verdünnt eingesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper sind in der Tabellen 6.1 aufgelistet. Der Nachweis von HA-Epitop-markierten Proteinen erfolgte mit dem monoklonalen Anti-HA-Antikörper 12CA5 außer im Fall der endogen exprimierten Aktivator-Derivate (Abb. 8.13), für deren Detektion der monoklonale Anti-HA-Antikörper 16B12 verwendet wurde. Myc-Epitop-markierte Proteine wurden mit dem monoklonalen Anti-Myc-Antikörper 9E10 nachgewiesen mit Ausnahme des technischen CoIP-Experiments (Abb. 8.4 im Anhang), in welchem Cdc23-Myc9 mit dem polyklonalen Anti-Myc-Antikörper A-14 detektiert wurde. Die Detektion der Westernblots erfolgte mit sekundären Antikörpern, die mit Infrarot-Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt waren (Tabelle 6.2) und einem Odyssey Infrared Imaging System mit der Odyssey Application Software 3.0.21 (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg).

Tabelle 6.1: Liste der verwendeten primären Antikörper und Antiseren für die Westernblot-Analyse

Name	Beschreibung und Quelle	Verdünnung
12CA5	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das HA-Epitop (Field <i>et al.</i> , 1988)	1:50
16B12	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das HA-Epitop (Covance Corporation, Princeton, NJ, USA)	1:500
9E10	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das c-Myc-Epitop (Evan <i>et al.</i> , 1985)	1:100
A-14	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das c-Myc-Epitop (sc-789, Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX, USA)	1:500
M2	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)	1:20000
Anti-GFP	Mischung zweier monoklonaler Maus-Antikörper gegen GFP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	1:5000
Anti-Clb2	Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen Clb2 (Amon <i>et al.</i> , 1994)	1:5000
Anti-Tub2	Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen β -Tubulin (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln)	1:6000
Anti-Gcd11	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen Gcd11 (Perzlsmaier <i>et al.</i> , 2013)	1:5000

Tabelle 6.2: Liste der verwendeten sekundären Antikörper für die Westernblot-Analyse

Name	Quelle	Verdünnung
Ziege-Anti-Maus-IRDye 800CW	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg	1:15000
Ziege-Anti-Kaninchen-IRDye 800CW	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg	1:15000
Ziege-Anti-Kaninchen-IRDye 680LT	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg	1:15000

Für die Quantifizierung der detektierten Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe der *gel analyzer function* von ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) integrierte

density plots erstellt. Hierzu wurde jede Spur, die ein zu quantifizierendes Signal enthielt, in ihrer gesamten Länge mit einem Rechteck markiert. Für alle Rechtecke wurde dieselbe Breite gewählt, die sich nach dem schmalsten Signal in den analysierten Spuren richtete. Nach Erstellen des *density plots* wurde eine Grundlinien-Subtraktion durchgeführt, indem eine Linie auf Höhe des integrierten Hintergrundsignals gezogen wurde. Anschließend wurde die Fläche innerhalb der dadurch geschlossenen Signalspitzen mit Hilfe des *wand tool* gemessen. Die statistische Auswertung der Messdaten wurde in Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) durchgeführt und die Erstellung der Graphen erfolgte mit GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

6.6 Messung des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Zellzyklusprogression wurde der DNA-Gehalt von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt (Haase und Reed, 2002). Um die DNA der Zellen färben zu können, wurden die Zellen zunächst mit 70% Ethanol fixiert. Dazu wurden 1 OD₆₀₀ Zellen (ca. 1×10^7 Zellen) durch Zentrifugieren geerntet, in 150 µl Wasser resuspendiert und anschließend mit 350 µl Ethanol gemischt. Die fixierten Zellen wurden mit 1 ml Natriumcitrat-Puffer (50 mM; pH 7.0) gewaschen und danach in 500 µl Puffer aufgenommen. Zur Auflösung möglicher Zellaggregate in Folge der Fixierung wurden die Zellen mit einem Sonopuls Ultraschall-Homogenisator HD2070 (Bandelin Electronics GmbH & Co KG, Berlin) behandelt (6 Impulse mit 40% Leistung).

Im Anschluss wurden 0,25 OD₆₀₀ Zellen in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Volumen mit Natriumcitrat-Puffer auf 250 µl aufgefüllt. Zur Entfernung von RNA wurden 10 µl RNase A-Lösung (siehe Kapitel 6.2.1) zu den Zellen gegeben und der Ansatz für 1 h in einem Thermomixer 5346 (Eppendorf AG, Hamburg) bei 50°C inkubiert. Um Proteine aus dem Ansatz zu entfernen, wurden anschließend 10 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml Proteinase K; 10 mM Tris/HCl pH 7.5; 1 mM Calciumacetat) zugegeben und erneut 1 h im Thermomixer bei 50°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet und zur Färbung der DNA in 250 µl Natriumcitrat-Puffer mit 1 µM Sytox Green (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) resuspendiert. Die Zellen wurden für mindestens 2 Tage bei 4°C gefärbt.

Die Messung des DNA-Gehalts erfolgte mit einem CyFlow Space Durchflusszytometer und der Windows™ FloMax® Software (Partec GmbH, Münster). Hierzu wurden 20 µl Zellen mit 1 ml Tris/HCl-Puffer (0,5 M; pH 7.5) gemischt und je Ansatz 20.000 Zellen im Kanal FL1 (Gain: 565; Skala: linear; Lower Limit: 50) gemessen. Die Geschwindigkeit wurde so gewählt, dass 200 – 400 Ereignisse pro Sekunde gezählt wurden. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm WinMDI 2.8 (Joe Trotter).

6.7 Wachstumstest von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihe

Das Wachstum von Hefestämmen wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe untersucht. Hierzu wurden die Stämme über Nacht bei 30°C in 5 ml Flüssigmedium (Tabelle 8.9 im Anhang) in einem Glasröhrchen auf einem TC-7-Reagenzglasroller (New Brunswick Scientific GmbH, Nürnberg) angezogen, bis die Kulturen stationär waren ($OD_{600}/ml > 3$). Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in einer 96-Well Mikrotiterplatte (Brand GmbH & Co KG, Wertheim) hergestellt. Dazu wurden von jedem Stamm 0,2 OD_{600} Zellen (entspricht 2×10^6 Zellen) in die erste Vertiefung einer Reihe vorgelegt und das Volumen mit sterilem Wasser auf 200 μ l aufgefüllt. Ausgehend von dieser Zellsuspension wurden Verdünnungen in 1:10 Schritten in den nachfolgenden fünf Vertiefungen der Reihe erstellt. Durch Replikaplattierung mit Hilfe eines Metallstempels (siehe Kapitel 6.1.2.2) wurden die Zellen auf geeignete Agarplatten (Tabelle 8.9 im Anhang) übertragen und die Platten anschließend unter den zu testenden Bedingungen inkubiert.

6.8 WD40-Spezifitäts-Screen

Um Bereiche in den WD40-Domänen der Aktivatoren zu identifizieren, die zu der Ausbildung der unterschiedlichen Substratspezifität von Cdc20 und Cdh1 beitragen, wurde ein genetischer Screen aufgesetzt. Hierzu wurden mittels *error prone* PCR zufällig Mutationen in die von *CDH1* stammende Region von *N* und mit der 5'-Region von *CDC20* fusioniert, die für die N-terminale Domäne von Cdc20 codiert. Die so hergestellten, mutierten Derivate der N20WD1-Chimäre wurden anschließend auf ihre Fähigkeit getestet, Zellwachstum in Abwesenheit von Cdc20 und Clb5 zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die mutierten N20WD1-Konstrukte mit Hilfe eines ARS/CEN-Plasmids in den Stamm W13000 (Tabelle 8.2 im Anhang) eingebracht, in welchem das *CLB5*-Gen deletiert ist und die Expression von *CDC20* durch Methionin gezielt abgeschaltet werden kann. Nach Abschalten der *CDC20*-Expression ist unter diesen Bedingungen die Degradation von Pds1 für die Lebensfähigkeit der Zellen erforderlich (Thornton und Toczyski, 2003). Somit konnte mit dieser Herangehensweise auf N20WD1-Mutanten selektiert werden, deren Mutationen die Spezifität der WD40-Domäne von Cdh1 in einer Weise verändern, die eine Erkennung von Pds1 *in vivo* ermöglicht.

6.8.1 Zufallsmutagenese der WD40-Domäne von N20WD1 mittels *error prone* PCR

Um die von Cdh1 stammende WD40-Domäne in N20WD1 zu mutagenisieren, wurde die entsprechende, codierende Region mittels *error prone* PCR amplifiziert. Hierzu wurde das integrative Plasmid pWS1236, welches das N20WD1-Konstrukt enthält, als DNA-Matrize verwendet (Tabelle 8.3 im Anhang). Der verwendete *forward primer* WS2519 (Tabelle 8.7 im Anhang) bindet ab dem Basenpaar 711 in *CDC20* und schließt eine interne PacI-Restriktionsschnittstelle mit ein, die für die spätere Klonierung genutzt wurde. WS2520

bindet als *reverse primer* (Tabelle 8.7 im Anhang) im Vektorrückgrat von pRS305 und amplifizierte die 3'-Region von *CDH1* einschließlich 59 Basenpaaren nach dem Stopp-Codon und einer XhoI-Schnittstelle des Vektors, welche für die spätere Klonierung genutzt wurde. Die PCR erfolgte in Gegenwart von $MnCl_2$ und erhöhter Mengen an dCTP- und dTTP-Nukleotiden, um eine erhöhte Fehlerrate während der Amplifikation zu erzwingen. Zudem wurde die *Taq*-Polymerase (Biomaster GmbH, Windeck) aus *Thermus aquaticus* verwendet, welche keine Korrekturlesefunktion besitzt. Die Zufallsmutagenese erfolgte in zwei separaten Ansätzen mit unterschiedlichen $MnCl_2$ -Konzentrationen (0,25 mM und 0,5 mM) in folgenden Zusammensetzungen:

	Ansatz 1	Ansatz 2
10x Mutagenese-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8.5; 500 mM KCl; 70 mM $MgCl_2$)	20 μ l	20 μ l
$MnCl_2$ (10 mM)	5 μ l	10 μ l
dATP (100 mM)	0,4 μ l	0,4 μ l
dGTP (100 mM)	0,4 μ l	0,4 μ l
dCTP (100 mM)	2 μ l	2 μ l
dTTP (100 mM)	2 μ l	2 μ l
WS2519 (100 μ M)	2 μ l	4 μ l
WS2520 (100 μ M)	2 μ l	4 μ l
pWS1236 (230 ng/ μ l)	0,2 μ l	0,2 μ l
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	4 μ l	4 μ l
H ₂ O	ad 200 μ l	ad 200 μ l

Die PCR-Ansätze wurden auf jeweils 8 Ansätze mit 25 μ l Volumen aufgeteilt, um die Ausbeute an verschiedenen Mutationen zu erhöhen. Das Temperaturprofil für die Reaktion wurde wie folgt gewählt:

Denaturierung	94°C	4 min	} 9 Zyklen
Denaturierung	94°C	1 min	
<i>annealing</i>	58°C	1 min	
Amplifikation	72°C	2 min	
Restamplifikation	72°C	5 min	

Im Anschluss an die Amplifikation wurden die aufgeteilten Reaktionen jedes Ansatzes wieder vereint und mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) gereinigt. Durch Klonierung in pWS4129 (*pCDC20-HA-N20WD1* in YCplac33) wurde die Region in *N20WD1*, die für die WD40-Domäne von Cdh1 codiert, mit den mutagenisierten PCR-Produkten ersetzt. Hierzu wurden sowohl pWS4129 als auch die Mutagenese-Ansätze mit den Restriktionsenzymen PacI und XhoI behandelt, anschließend ligiert und zur Vermehrung in DH5 α -Zellen eingebracht (siehe Kapitel 6.2.3). Dabei wurde jeweils der gesamte PCR-Ansatz in die Klonierung eingesetzt. Nach der Transformation wurden die DH5 α -Zellen für jeden Ansatz in 80 ml LB-Amp-Flüssigmedium (Tabelle 8.8 im Anhang) überführt und über Nacht in einem Aquatron-Schüttelwasserbad (Infors AG, Einsbach) bei 37°C kultiviert. Anschließend

wurden die Plasmide mit Hilfe des GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kits (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) isoliert. Die isolierte Plasmid-Genbank pWS4145 enthält die mutagenisierten *N20WD1*-Konstrukte aus dem 0,25 mM MnCl₂-Ansatz und pWS4146 enthält die mutagenisierten *N20WD1*-Konstrukte aus dem 0,5 mM MnCl₂-Ansatz.

6.8.2 Identifizierung von *N20WD1*-Mutanten mit *Cdc20*-Spezifität

Um *N20WD1*-Mutanten zu identifizieren, deren Spezifität sich in Folge der Zufallsmutagenese in Richtung der Spezifität von *Cdc20* geändert hatte, wurde der Stamm W13000 (Tabelle 8.2 im Anhang) mit den mutagenisierten Plasmiden transformiert (Kapitel 6.1.1). In diesem Stamm ist das *CLB5*-Gen deletiert und die Expression von *CDC20* steht unter Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotors, der in Anwesenheit von Methionin reprimiert ist. Somit konnte durch Ausplattieren der transformierten Zellen auf Agarplatten (Tabelle 8.9 im Anhang) mit Methionin (restriktiv; keine Expression von *CDC20*) auf mutagenisierte *N20WD1*-Plasmide selektiert werden, die Zellwachstum in Abwesenheit von *Cdc20* ermöglichen. Die Transformationsplatten enthielten kein Uracil, um einen Verlust der ARS/CEN-Plasmide zu vermeiden.

Die Transformanten, die auf den Agarplatten mit Methionin Kolonien bildeten, wurden anschließend auf Agarplatten (Tabelle 8.9 im Anhang) ohne Uracil (zur Selektion auf das Plasmid) und ohne Methionin (*CDC20* exprimiert) ausgestrichen, um das Wachstum unter permissiven Bedingungen zu testen. Anschließend wurden die ARS/CEN-Plasmide aus den angewachsenen Transformanten mit Hilfe einer Phenol/Chloroform-Extraktion für die anschließende Vermehrung in *E. coli* isoliert (Hoffman und Winston, 1987). Hierzu wurden die Stämme über Nacht in je 5 ml Flüssigmedium (Tabelle 8.9 im Anhang) ohne Uracil und Methionin (permissiv) in Glasröhrchen auf einem TC-7-Reagenzglasroller (New Brunswick Scientific GmbH, Nürnberg) bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet (2 min, 805 x *g*) und in Wasser aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen auf 200 µl neutralisierte Glasperlen (Kapitel 6.2.1) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert und das überstehende Wasser abgezogen. Danach wurden 50 µl TE/SDS-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5; 1 mM EDTA; 1% SDS) und 100 µl einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) zu den Zellen gegeben und die Zellen in einer Schwingmühle MM200 oder MM2000 (Kurt Retsch GmbH, Haan) durch Schütteln bei maximaler Frequenz und 4°C für 2 min mechanisch aufgeschlossen. Zellfragmente wurden durch 10 min Zentrifugieren bei 20800 x *g* und 4°C entfernt. Von der wässrigen Phase wurde 1 µl ohne Dialyse für die Transformation von DH5α-Zellen eingesetzt (Kapitel 6.2.3.4). Die Plasmide wurden in den DH5α-Zellen vermehrt und isoliert (Kapitel 6.2.3.5), um den Stamm W13000 anschließend erneut mit den Plasmiden zu transformieren. Von den ursprünglich 30 Transformanten, die aus vierzehn (Genbank 1) bzw. acht (Genbank 2) Transformationen resultierten, konnten schließlich 14 Plasmide gewonnen werden, mit denen sich W13000 erfolgreich re-transformieren ließ (Tabelle 8.1 im Anhang). Die Plasmide, die nach Re-Transformation von W13000 mindestens 7 Kolonien bildeten, wurden sequenziert (Seqlab Sequence

Laboratories GmbH, Göttingen) und die dadurch gefundenen Mutationen sind in Tabelle 8.1 im Anhang aufgeführt.

6.9 Bioinformatische Analysen und Modellierung der WD40-Domäne

Die Durchsuchung der Aminosäuresequenz von Cdh1 nach möglichen Kernlokalisations-Sequenzen und Kernexportsignalen erfolgte mit den Programmen cNLS-Mapper (Kosugi *et al.*, 2009) bzw. NetNES (la Cour *et al.*, 2004). Dabei wurde die Sequenz der Aminosäuren 1-257 von Cdh1 mit den Standardeinstellungen der Programme analysiert. Im Fall des cNLS-Mappers wurde die Suche nach einer bipartiten NLS mit langer Linker-Region für die gesamte Sequenz von Cdh1(1-257) durchgeführt. Als Quelle für die Aminosäuresequenz diente die Datenbank UniProt (uniprot.org).

Um die Aminosäuresequenzen der Aktivatoren aus verschiedenen Spezies hinsichtlich der Konservierung zu vergleichen, wurde das Programm Jalview (jalview.org; Waterhouse *et al.*, 2009) verwendet. Hierzu wurden die entsprechenden Aminosäuresequenzen der UniProt-Datenbank entnommen und in Jalview geöffnet. Anschließend wurden zunächst die Sequenzen der Cdc20- und Cdh1-Orthologen separat mit dem ClustalW-Algorithmus angeordnet. Die dadurch erstellten Sequenzvergleiche für Cdc20 und Cdh1 wurden anschließend für eine erneute Anordnung mit ClustalW (*re-alignment*) zur Erstellung der Abbildung 8.1 im Anhang genutzt. Diese Sequenzanordnung diente als Vorlage für die Erstellung von Abbildung 5.2.

Für die Analyse von DNA-Sequenzen nach Sequenzierung, z. B. zur Identifizierung von Mutationen aus der Zufallsmutagenese der WD40-Domäne, wurde ein PSA (*pairwise sequence alignment*) der DNA-Sequenz aus der Sequenzierung und einer Referenzsequenz aus der *Saccharomyces*-Genom-Datenbank (yeastgenome.org) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit dem Programm Needle von EMBOSS, das auf dem Needleman-Wunsch-Algorithmus basiert (ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html).

Der SWISS-MODEL-Server (swissmodel.expasy.org; Arnold *et al.*, 2006) wurde genutzt, um die Raumstruktur der WD40-Domäne von Cdh1 darzustellen. Als Vorlage diente die publizierte Kristallstruktur von Cdh1 (PDB-Nummer 4BH6; He *et al.*, 2013). Die Darstellung und Bearbeitung der Struktur, z. B. zur Markierung von Aminosäuren, erfolgte mit dem Programm UCSF Chimera 1.8.1 der Universität von Kalifornien (cgl.ucsf.edu/chimera; Pettersen *et al.*, 2004).

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Almeida, A.** (2012). Regulation of APC/C-Cdh1 and its function in neuronal survival. *Mol Neurobiol* 46(3): 547-554.
- Amerik, A. Y. und M. Hochstrasser** (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 189-207.
- Amon, A., S. Irniger und K. Nasmyth** (1994). Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell* 77(7): 1037-1050.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp und T. Schwede** (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22(2): 195-201.
- Arnold, L., S. Höckner und W. Seufert** (2015). Insights into the cellular mechanism of the yeast ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 from the analysis of in vivo degrons. *Mol Biol Cell* 26(5): 843-858.
- Barford, D.** (2011). Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1584): 3605-3624.
- Barral, Y., M. Parra, S. Bidlingmaier und M. Snyder** (1999). Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev* 13(2): 176-187.
- Bashir, T., N. V. Dorrello, V. Amador, D. Guardavaccaro und M. Pagano** (2004). Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 428(6979): 190-193.
- Bauer, A.** (2013). Studien zur Funktion und Lokalisierung der Aktivatoren der Ubiquitin-Ligase APC/C. *Bachelorarbeit*, Universität Regensburg.
- Baumer, M., M. Kunzler, P. Steigemann, G. H. Braus und S. Irniger** (2000). Yeast Ran-binding protein Yrb1p is required for efficient proteolysis of cell cycle regulatory proteins Pds1p and Sic1p. *J Biol Chem* 275(49): 38929-38937.
- Bell, S. P. und A. Dutta** (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71: 333-374.
- Benmaamar, R. und M. Pagano** (2005). Involvement of the SCF complex in the control of Cdh1 degradation in S-phase. *Cell Cycle* 4(9): 1230-1232.
- Berghammer, H. und B. Auer** (1993). "Easypreps": fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in E. coli. *Biotechniques* 14(4): 524, 528.
- Blanco, M. A., L. Pelloquin und S. Moreno** (2001). Fission yeast mfr1 activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *J Cell Sci* 114(Pt 11): 2135-2143.
- Blanco, M. A., A. Sanchez-Diaz, J. M. de Prada und S. Moreno** (2000). APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *EMBO J* 19(15): 3945-3955.
- Bloom, J. und F. R. Cross** (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2): 149-160.
- Boettcher, B. und Y. Barral** (2013). The cell biology of open and closed mitosis. *Nucleus* 4(3): 160-165.
- Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues und A. I. Lamond** (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 574-585.
- Booher, R. N., R. J. Deshaies und M. W. Kirschner** (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *Embo J* 12(9): 3417-3426.
- Boustany, L. M. und M. S. Cyert** (2002). Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev* 16(5): 608-619.
- Braman, J., C. Papworth und A. Greener** (1996). Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol* 57: 31-44.
- Burton, J. L. und M. J. Solomon** (2000). Hsl1p, a Swe1p inhibitor, is degraded via the anaphase-promoting complex. *Mol Cell Biol* 20(13): 4614-4625.

- Burton, J. L. und M. J. Solomon** (2001). D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev* 15(18): 2381-2395.
- Burton, J. L. und M. J. Solomon** (2007). Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APCCdc20 in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev* 21(6): 655-667.
- Burton, J. L., Y. Xiong und M. J. Solomon** (2011). Mechanisms of pseudosubstrate inhibition of the anaphase promoting complex by Acn1. *Embo J* 30(9): 1818-1829.
- Buschhorn, B. A., G. Petzold, M. Galova, P. Dube, C. Kraft, F. Herzog, . . . J. M. Peters** (2011). Substrate binding on the APC/C occurs between the coactivator Cdh1 and the processivity factor Doc1. *Nat Struct Mol Biol* 18(1): 6-13.
- Cabib, E.** (2004). The septation apparatus, a chitin-requiring machine in budding yeast. *Arch Biochem Biophys* 426(2): 201-207.
- Camasses, A., A. Bogdanova, A. Shevchenko und W. Zachariae** (2003). The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20. *Mol Cell* 12(1): 87-100.
- Cao, L., W. Yu, Y. Wu und L. Yu** (2009). The evolution, complex structures and function of septin proteins. *Cell Mol Life Sci* 66(20): 3309-3323.
- Cardozo, T. und M. Pagano** (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9): 739-751.
- Carroll, C. W., M. Enquist-Newman und D. O. Morgan** (2005). The APC subunit Doc1 promotes recognition of the substrate destruction box. *Curr Biol* 15(1): 11-18.
- Carroll, C. W. und D. O. Morgan** (2002). The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase-promoting complex. *Nat Cell Biol* 4(11): 880-887.
- Casamayor, A. und M. Snyder** (2002). Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* 5(2): 179-186.
- Castro, A., Y. Arlot-Bonnemains, S. Vigneron, J. C. Labbe, C. Prigent und T. Lorca** (2002). APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep* 3(5): 457-462.
- Chang, F. und I. Herskowitz** (1990). Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell* 63(5): 999-1011.
- Chang, L. und D. Barford** (2014). Insights into the anaphase-promoting complex: a molecular machine that regulates mitosis. *Curr Opin Struct Biol* 29: 1-9.
- Chang, L., Z. Zhang, J. Yang, S. H. McLaughlin und D. Barford** (2014). Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. *Nature* 513(7518): 388-393.
- Chang, L., Z. Zhang, J. Yang, S. H. McLaughlin und D. Barford** (2015). Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination. *Nature* 522(7557): 450-454.
- Chao, W. C., K. Kulkarni, Z. Zhang, E. H. Kong und D. Barford** (2012). Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* 484(7393): 208-213.
- Charles, J. F., S. L. Jaspersen, R. L. Tinker-Kulberg, L. Hwang, A. Szidon und D. O. Morgan** (1998). The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 8(9): 497-507.
- Choi, E., J. M. Dial, D. E. Jeong und M. C. Hall** (2008). Unique D box and KEN box sequences limit ubiquitination of Acn1 and promote pseudosubstrate inhibition of the anaphase-promoting complex. *J Biol Chem* 283(35): 23701-23710.
- Ciosk, R., W. Zachariae, C. Michaelis, A. Shevchenko, M. Mann und K. Nasmyth** (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* 93(6): 1067-1076.
- Clute, P. und J. Pines** (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* 1(2): 82-87.
- Cohen-Fix, O. und D. Koshland** (1997). The metaphase-to-anaphase transition: avoiding a mid-life crisis. *Curr Opin Cell Biol* 9(6): 800-806.

- Cohen-Fix, O., J. M. Peters, M. W. Kirschner und D. Koshland** (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* 10(24): 3081-3093.
- Cormack, B. P., G. Bertram, M. Egerton, N. A. Gow, S. Falkow und A. J. Brown** (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143 (Pt 2): 303-311.
- Craney, A., A. Kelly, L. Jia, I. Fedrigo, H. Yu und M. Rape** (2016). Control of APC/C-dependent ubiquitin chain elongation by reversible phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(6): 1540-1545.
- Crasta, K., H. H. Lim, T. H. Giddings, Jr., M. Winey und U. Surana** (2008). Inactivation of Cdh1 by synergistic action of Cdk1 and polo kinase is necessary for proper assembly of the mitotic spindle. *Nat Cell Biol* 10(6): 665-675.
- Cross, F. R. und A. H. Tinkelenberg** (1991). A potential positive feedback loop controlling CLN1 and CLN2 gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* 65(5): 875-883.
- Crutchley, J., K. M. King, M. A. Keaton, L. Szkotnicki, D. A. Orlando, T. R. Zyla, . . . D. J. Lew** (2009). Molecular dissection of the checkpoint kinase Hsl1p. *Mol Biol Cell* 20(7): 1926-1936.
- D'Ambrosio, C., G. Kelly, K. Shirahige und F. Uhlmann** (2008). Condensin-dependent rDNA decatenation introduces a temporal pattern to chromosome segregation. *Curr Biol* 18(14): 1084-1089.
- da Fonseca, P. C., E. H. Kong, Z. Zhang, A. Schreiber, M. A. Williams, E. P. Morris und D. Barford** (2011). Structures of APC/C(Cdh1) with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature* 470(7333): 274-278.
- Dahmann, C., J. F. Diffley und K. A. Nasmyth** (1995). S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr Biol* 5(11): 1257-1269.
- Davenport, J., L. D. Harris und R. Goorha** (2006). Spindle checkpoint function requires Mad2-dependent Cdc20 binding to the Mad3 homology domain of BubR1. *Exp Cell Res* 312(10): 1831-1842.
- Dawson, I. A., S. Roth und S. Artavanis-Tsakonas** (1995). The *Drosophila* cell cycle gene *fizzy* is required for normal degradation of cyclins A and B during mitosis and has homology to the CDC20 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 129(3): 725-737.
- De Antoni, A., C. G. Pearson, D. Cimini, J. C. Canman, V. Sala, L. Nezi, . . . A. Musacchio** (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 15(3): 214-225.
- den Elzen, N. und J. Pines** (2001). Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol* 153(1): 121-136.
- Den Haese, G. J., N. Walworth, A. M. Carr und K. L. Gould** (1995). The Wee1 protein kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast Cdc2. *Mol Biol Cell* 6(4): 371-385.
- Deshaies, R. J. und J. E. Ferrell, Jr.** (2001). Multisite phosphorylation and the countdown to S phase. *Cell* 107(7): 819-822.
- Deshaies, R. J. und C. A. Joazeiro** (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399-434.
- DeVit, M. J. und M. Johnston** (1999). The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 9(21): 1231-1241.
- Di Fiore, B., N. E. Davey, A. Hagting, D. Izawa, J. Mansfeld, T. J. Gibson und J. Pines** (2015). The ABBA motif binds APC/C activators and is shared by APC/C substrates and regulators. *Dev Cell* 32(3): 358-372.
- Di Fiore, B. und J. Pines** (2010). How cyclin A destruction escapes the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 190(4): 501-509.
- Dial, J. M., E. V. Petrotchenko und C. H. Borchers** (2007). Inhibition of APCCdh1 activity by Cdh1/Acm1/Bmh1 ternary complex formation. *J Biol Chem* 282(8): 5237-5248.
- Dirick, L. und K. Nasmyth** (1991). Positive feedback in the activation of G1 cyclins in yeast. *Nature* 351(6329): 754-757.

- Donaldson, A. D., M. K. Raghuraman, K. L. Friedman, F. R. Cross, B. J. Brewer und W. L. Fangman (1998). CLB5-dependent activation of late replication origins in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 2(2): 173-182.
- Dong, X., A. Biswas, K. E. Suel, L. K. Jackson, R. Martinez, H. Gu und Y. M. Chook (2009). Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature* 458(7242): 1136-1141.
- Dong, X., K. H. Zavitz, B. J. Thomas, M. Lin, S. Campbell und S. L. Zipursky (1997). Control of G1 in the developing *Drosophila* eye: rca1 regulates Cyclin A. *Genes Dev* 11(1): 94-105.
- Drury, L. S., G. Perkins und J. F. Diffley (2000). The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle. *Curr Biol* 10(5): 231-240.
- Dube, P., F. Herzog, C. Gieffers, B. Sander, D. Riedel, S. A. Muller, . . . H. Stark (2005). Localization of the coactivator Cdh1 and the cullin subunit Apc2 in a cryo-electron microscopy model of vertebrate APC/C. *Mol Cell* 20(6): 867-879.
- Eguren, M., E. Manchado und M. Malumbres (2011). Non-mitotic functions of the Anaphase-Promoting Complex. *Semin Cell Dev Biol* 22(6): 572-578.
- Elia, A. E., P. Rellos, L. F. Haire, J. W. Chao, F. J. Ivins, K. Hoepker, . . . M. B. Yaffe (2003). The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* 115(1): 83-95.
- Elsasser, S., Y. Chi, P. Yang und J. L. Campbell (1999). Phosphorylation controls timing of Cdc6p destruction: A biochemical analysis. *Mol Biol Cell* 10(10): 3263-3277.
- Enquist-Newman, M., M. Sullivan und D. O. Morgan (2008). Modulation of the mitotic regulatory network by APC-dependent destruction of the Cdh1 inhibitor Acm1. *Mol Cell* 30(4): 437-446.
- Enserink, J. M. und R. D. Kolodner (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div* 5: 11.
- Epp, J. A. und J. Chant (1997). An IQGAP-related protein controls actin-ring formation and cytokinesis in yeast. *Curr Biol* 7(12): 921-929.
- Epstein, C. B. und F. R. Cross (1992). CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev* 6(9): 1695-1706.
- Evan, G. I., G. K. Lewis, G. Ramsay und J. M. Bishop (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5(12): 3610-3616.
- Fang, G. (2002). Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell* 13(3): 755-766.
- Fang, G., H. Yu und M. W. Kirschner (1998). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell* 2(2): 163-171.
- Ferreira, M. F., C. Santocanale, L. S. Drury und J. F. Diffley (2000). Dbf4p, an essential S phase-promoting factor, is targeted for degradation by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell Biol* 20(1): 242-248.
- Ferrell, J. E., Jr. und S. H. Ha (2014). Ultrasensitivity part II: multisite phosphorylation, stoichiometric inhibitors, and positive feedback. *Trends Biochem Sci* 39(11): 556-569.
- Field, J., J. Nikawa, D. Broek, B. MacDonald, L. Rodgers, I. A. Wilson, . . . M. Wigler (1988). Purification of a RAS-responsive adenyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* 8(5): 2159-2165.
- Foe, I. T., S. A. Foster, S. K. Cheung, S. Z. Deluca, D. O. Morgan und D. P. Toczyski (2011). Ubiquitination of Cdc20 by the APC Occurs through an Intramolecular Mechanism. *Curr Biol* 21(22): 1870-1877.
- Forsburg, S. L. und P. Nurse (1991). Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol* 7: 227-256.
- Foster, S. A. und D. O. Morgan (2012). The APC/C subunit Mnd2/Apc15 promotes Cdc20 autoubiquitination and spindle assembly checkpoint inactivation. *Mol Cell* 47(6): 921-932.
- Frye, J. J., N. G. Brown, G. Petzold, E. R. Watson, C. R. Grace, A. Nourse, . . . B. A. Schulman (2013). Electron microscopy structure of human APC/C(CDH1)-EMI1 reveals multimodal mechanism of E3 ligase shutdown. *Nat Struct Mol Biol* 20(7): 827-835.

- Fujimitsu, K., M. Grimaldi und H. Yamano** (2016). Cyclin-dependent kinase 1-dependent activation of APC/C ubiquitin ligase. *Science* 352(6289): 1121-1124.
- Fukushima, H., K. Ogura, L. Wan, Y. Lu, V. Li, D. Gao, . . . W. Wei** (2013). SCF-Mediated Cdh1 Degradation Defines a Negative Feedback System that Coordinates Cell-Cycle Progression. *Cell Rep* 4(4): 803-816.
- Gadal, O., D. Strauss, J. Kessl, B. Trumpower, D. Tollervey und E. Hurt** (2001). Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* 21(10): 3405-3415.
- Geley, S., E. Kramer, C. Gieffers, J. Gannon, J. M. Peters und T. Hunt** (2001). Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 153(1): 137-148.
- Ghoshal, K., J. Datta, S. Majumder, S. Bai, H. Kutay, T. Motiwala und S. T. Jacob** (2005). 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 25(11): 4727-4741.
- Gieffers, C., B. H. Peters, E. R. Kramer, C. G. Dotti und J. M. Peters** (1999). Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11317-11322.
- Gietz, R. D. und A. Sugino** (1988). New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74(2): 527-534.
- Gietz, R. D. und R. A. Woods** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350: 87-96.
- Glotzer, M., A. W. Murray und M. W. Kirschner** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349(6305): 132-138.
- Golan, A., Y. Yudkovsky und A. Hershko** (2002). The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem* 277(18): 15552-15557.
- Gordon, D. M. und D. M. Roof** (2001). Degradation of the kinesin Kip1p at anaphase onset is mediated by the anaphase-promoting complex and Cdc20p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12515-12520.
- Grosskortenhaus, R. und F. Sprenger** (2002). Rca1 inhibits APC-Cdh1(Fzr) and is required to prevent cyclin degradation in G2. *Dev Cell* 2(1): 29-40.
- Haase, S. B. und S. I. Reed** (2002). Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle* 1(2): 132-136.
- Hacker, S.** (2012). Studien zur Lokalisation und Degradation der APC/C-Coaktivatoren Cdh1 und Cdc20. *Bachelorarbeit*, Universität Regensburg.
- Hagting, A., N. Den Elzen, H. C. Vodermaier, I. C. Waizenegger, J. M. Peters und J. Pines** (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* 157(7): 1125-1137.
- Hall, M. C., D. E. Jeong, J. T. Henderson, E. Choi, S. C. Bremmer, A. B. Iliuk und H. Charbonneau** (2008). Cdc28 and Cdc14 control stability of the anaphase-promoting complex inhibitor Acm1. *J Biol Chem* 283(16): 10396-10407.
- Hall, M. C., E. N. Warren und C. H. Borchers** (2004). Multi-kinase phosphorylation of the APC/C activator Cdh1 revealed by mass spectrometry. *Cell Cycle* 3(10): 1278-1284.
- Hames, R. S., S. L. Wattam, H. Yamano, R. Bacchieri und A. M. Fry** (2001). APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *EMBO J* 20(24): 7117-7127.
- Hansen, D. V., A. V. Loktev, K. H. Ban und P. K. Jackson** (2004). Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* 15(12): 5623-5634.
- Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, J. Culotti und M. Culotti** (1973). Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants. *Genetics* 74(2): 267-286.

- Hartwell, L. H. und T. A. Weinert** (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246(4930): 629-634.
- Harvey, S. L., A. Charlet, W. Haas, S. P. Gygi und D. R. Kellogg** (2005). Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell* 122(3): 407-420.
- Harvey, S. L., G. Enciso, N. Dephoure, S. P. Gygi, J. Gunawardena und D. R. Kellogg** (2011). A phosphatase threshold sets the level of Cdk1 activity in early mitosis in budding yeast. *Mol Biol Cell* 22(19): 3595-3608.
- Hayes, M. J., Y. Kimata, S. L. Wattam, C. Lindon, G. Mao, H. Yamano und A. M. Fry** (2006). Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20-independent interaction with the APC/C. *Nat Cell Biol* 8(6): 607-614.
- He, J., W. C. Chao, Z. Zhang, J. Yang, N. Cronin und D. Barford** (2013). Insights into degron recognition by APC/C coactivators from the structure of an Acm1-Cdh1 complex. *Mol Cell* 50(5): 649-660.
- Hein, J. B. und J. Nilsson** (2016). Interphase APC/C-Cdc20 inhibition by cyclin A2-Cdk2 ensures efficient mitotic entry. *Nat Commun* 7: 10975.
- Hellmuth, S., F. Bottger, C. Pan, M. Mann und O. Stemmann** (2014). PP2A delays APC/C-dependent degradation of separase-associated but not free securin. *EMBO J* 33(10): 1134-1147.
- Hershko, A. und A. Ciechanover** (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
- Herskowitz, I.** (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52(4): 536-553.
- Herzog, F., I. Primorac, P. Dube, P. Lenart, B. Sander, K. Mechtler, . . . J. M. Peters** (2009). Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. *Science* 323(5920): 1477-1481.
- Hildebrandt, E. R. und M. A. Hoyt** (2001). Cell cycle-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle motor Cin8p requires APC(Cdh1) and a bipartite destruction sequence. *Mol Biol Cell* 12(11): 3402-3416.
- Hilioti, Z., Y. S. Chung, Y. Mochizuki, C. F. Hardy und O. Cohen-Fix** (2001). The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner. *Curr Biol* 11(17): 1347-1352.
- Höckner, S.** (2011). Studien zur Funktion und Regulation von Cdc20 im Zellteilungszyklus der Hefe. *Masterarbeit*, Universität Regensburg.
- Höckner, S., L. Neumann-Arnold und W. Seufert** (2016). Dual control by Cdk1 phosphorylation of the budding yeast APC/C ubiquitin ligase activator Cdh1. *Mol Biol Cell*, 10.1091/mbc.E15-11-0787.
- Hoffman, C. S. und F. Winston** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57(2-3): 267-272.
- Holt, L. J., A. N. Krutchinsky und D. O. Morgan** (2008). Positive feedback sharpens the anaphase switch. *Nature* 454(7202): 353-357.
- Holt, L. J., B. B. Tuch, J. Villen, A. D. Johnson, S. P. Gygi und D. O. Morgan** (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* 325(5948): 1682-1686.
- Honda, K., H. Mihara, Y. Kato, A. Yamaguchi, H. Tanaka, H. Yasuda, . . . T. Urano** (2000). Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 19(24): 2812-2819.
- Honda, R., E. D. Lowe, E. Dubinina, V. Skamnaki, A. Cook, N. R. Brown und L. N. Johnson** (2005). The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. *EMBO J* 24(3): 452-463.
- Hornig, N. C., P. P. Knowles, N. Q. McDonald und F. Uhlmann** (2002). The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol* 12(12): 973-982.
- Hsu, J. Y., J. D. Reimann, C. S. Sorensen, J. Lukas und P. K. Jackson** (2002). E2F-dependent accumulation of hEml1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat Cell Biol* 4(5): 358-366.

- Hu, D., W. Liu, G. Wu und Y. Wan (2011). Nuclear translocation of Skp2 facilitates its destruction in response to TGFbeta signaling. *Cell Cycle* 10(2): 285-292.
- Hu, Z., Y. Wang, L. Yu, S. K. Mahanty, N. Mendoza und E. A. Elion (2016). Mapping regions in Ste5 that support Msn5-dependent and -independent nuclear export. *Biochem Cell Biol* 94(2): 109-128.
- Huang, J. N., I. Park, E. Ellingson, L. E. Littlepage und D. Pellman (2001). Activity of the APC(Cdh1) form of the anaphase-promoting complex persists until S phase and prevents the premature expression of Cdc20p. *J Cell Biol* 154(1): 85-94.
- Huxley, C., E. D. Green und I. Dunham (1990). Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet* 6(8): 236.
- Izawa, D. und J. Pines (2012). Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *J Cell Biol* 199(1): 27-37.
- Izawa, D. und J. Pines (2015). The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C. *Nature* 517(7536): 631-634.
- Jackson, L. P., S. I. Reed und S. B. Haase (2006). Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6. *Mol Cell Biol* 26(6): 2456-2466.
- Jaquenoud, M., F. van Drogen und M. Peter (2002). Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C(Cdh1). *Embo J* 21(23): 6515-6526.
- Jaspersen, S. L., J. F. Charles und D. O. Morgan (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 9(5): 227-236.
- Jaspersen, S. L., B. J. Huneycutt, T. H. Giddings, Jr., K. A. Resing, N. G. Ahn und M. Winey (2004). Cdc28/Cdk1 regulates spindle pole body duplication through phosphorylation of Spc42 and Mps1. *Dev Cell* 7(2): 263-274.
- Jeffrey, P. D., A. A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massague und N. P. Pavletich (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376(6538): 313-320.
- Jones, J. S. und L. Prakash (1990). Yeast *Saccharomyces cerevisiae* selectable markers in pUC18 polylinkers. *Yeast* 6(5): 363-366.
- Jorgensen, P. M., E. Brundell, M. Starborg und C. Hoog (1998). A subunit of the anaphase-promoting complex is a centromere-associated protein in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 18(1): 468-476.
- Juang, Y. L., J. Huang, J. M. Peters, M. E. McLaughlin, C. Y. Tai und D. Pellman (1997). APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle. *Science* 275(5304): 1311-1314.
- Kaffman, A., N. M. Rank, E. M. O'Neill, L. S. Huang und E. K. O'Shea (1998). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* 396(6710): 482-486.
- Kelly, A., K. E. Wickliffe, L. Song, I. Fedrigo und M. Rape (2014). Ubiquitin chain elongation requires E3-dependent tracking of the emerging conjugate. *Mol Cell* 56(2): 232-245.
- Keppler-Ross, S., C. Noffz und N. Dean (2008). A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Genetics* 179(1): 705-710.
- Kim, S. Y. und J. E. Ferrell, Jr. (2007). Substrate competition as a source of ultrasensitivity in the inactivation of Wee1. *Cell* 128(6): 1133-1145.
- Kimata, Y., J. E. Baxter, A. M. Fry und H. Yamano (2008). A role for the Fizzy/Cdc20 family of proteins in activation of the APC/C distinct from substrate recruitment. *Mol Cell* 32(4): 576-583.
- King, E. M., S. J. van der Sar und K. G. Hardwick (2007). Mad3 KEN boxes mediate both Cdc20 and Mad3 turnover, and are critical for the spindle checkpoint. *PLoS One* 2(4): e342.
- King, R. W., J. M. Peters, S. Tugendreich, M. Rolfe, P. Hieter und M. W. Kirschner (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81(2): 279-288.
- Ko, N., R. Nishihama, G. H. Tully, D. Ostapenko, M. J. Solomon, D. O. Morgan und J. R. Pringle (2007). Identification of yeast IQGAP (Iqg1p) as an anaphase-promoting-complex substrate and its role in actomyosin-ring-independent cytokinesis. *Mol Biol Cell* 18(12): 5139-5153.

- Koivomagi, M., M. Ord, A. Iofik, E. Valk, R. Venta, I. Faustova, . . . M. Loog (2013). Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nat Struct Mol Biol* 20(12): 1415-1424.
- Koivomagi, M., E. Valk, R. Venta, A. Iofik, M. Lepiku, E. R. Balog, . . . M. Loog (2011a). Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature* 480(7375): 128-131.
- Koivomagi, M., E. Valk, R. Venta, A. Iofik, M. Lepiku, D. O. Morgan und M. Loog (2011b). Dynamics of Cdk1 substrate specificity during the cell cycle. *Mol Cell* 42(5): 610-623.
- Kosugi, S., M. Hasebe, T. Entani, S. Takayama, M. Tomita und H. Yanagawa (2008). Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling. *Chem Biol* 15(9): 940-949.
- Kosugi, S., M. Hasebe, M. Tomita und H. Yanagawa (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(25): 10171-10176.
- Kraft, C., F. Herzog, C. Gieffers, K. Mechtler, A. Hagting, J. Pines und J. M. Peters (2003). Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J* 22(24): 6598-6609.
- Kramer, E. R., C. Gieffers, G. Holzl, M. Hengstschlager und J. M. Peters (1998). Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr Biol* 8(22): 1207-1210.
- Kramer, E. R., N. Scheuringer, A. V. Podtelejnikov, M. Mann und J. M. Peters (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell* 11(5): 1555-1569.
- Kutay, U. und S. Guttinger (2005). Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol* 15(3): 121-124.
- la Cour, T., L. Kiemer, A. Molgaard, R. Gupta, K. Skriver und S. Brunak (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17(6): 527-536.
- Labit, H., K. Fujimitsu, N. S. Bayin, T. Takaki, J. Gannon und H. Yamano (2012). Dephosphorylation of Cdc20 is required for its C-box-dependent activation of the APC/C. *Embo J*.
- Lanker, S., M. H. Valdivieso und C. Wittenberg (1996). Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science* 271(5255): 1597-1601.
- Lara-Gonzalez, P., M. I. Scott, M. Diez, O. Sen und S. S. Taylor (2011). BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner. *J Cell Sci* 124(Pt 24): 4332-4345.
- Lara-Gonzalez, P., F. G. Westhorpe und S. S. Taylor (2012). The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 22(22): R966-980.
- Lew, D. J. und S. I. Reed (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol* 120(6): 1305-1320.
- Li, X. und R. B. Nicklas (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* 373(6515): 630-632.
- Liakopoulos, D., J. Kusch, S. Grava, J. Vogel und Y. Barral (2003). Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell* 112(4): 561-574.
- Liang, H., H. H. Lim, A. Venkitaraman und U. Surana (2012). Cdk1 promotes kinetochore bi-orientation and regulates Cdc20 expression during recovery from spindle checkpoint arrest. *EMBO J* 31(2): 403-416.
- Liku, M. E., V. Q. Nguyen, A. W. Rosales, K. Irie und J. J. Li (2005). CDK phosphorylation of a novel NLS-NES module distributed between two subunits of the Mcm2-7 complex prevents chromosomal rereplication. *Mol Biol Cell* 16(10): 5026-5039.
- Lindon, C. und J. Pines (2004). Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol* 164(2): 233-241.
- Listovsky, T., Y. S. Oren, Y. Yudkovsky, H. M. Mahbubani, A. M. Weiss, M. Lebediker und M. Brandeis (2004). Mammalian Cdh1/Fzr mediates its own degradation. *Embo J* 23(7): 1619-1626.

- Littlepage, L. E. und J. V. Ruderman** (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev* 16(17): 2274-2285.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachet, . . . J. R. Pringle** (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(10): 953-961.
- Loog, M. und D. O. Morgan** (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* 434(7029): 104-108.
- Lu, D., J. Y. Hsiao, N. E. Davey, V. A. Van Voorhis, S. A. Foster, C. Tang und D. O. Morgan** (2014). Multiple mechanisms determine the order of APC/C substrate degradation in mitosis. *J Cell Biol* 207(1): 23-39.
- Lukas, C., C. S. Sorensen, E. Kramer, E. Santoni-Rugiu, C. Lindene, J. M. Peters, . . . J. Lukas** (1999). Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* 401(6755): 815-818.
- Luo, X., G. Fang, M. Coldiron, Y. Lin, H. Yu, M. W. Kirschner und G. Wagner** (2000). Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20. *Nat Struct Biol* 7(3): 224-229.
- Luo, X., Z. Tang, J. Rizo und H. Yu** (2002). The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol Cell* 9(1): 59-71.
- Luo, X., Z. Tang, G. Xia, K. Wassmann, T. Matsumoto, J. Rizo und H. Yu** (2004). The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat Struct Mol Biol* 11(4): 338-345.
- Mailand, N. und J. F. Diffley** (2005). CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell* 122(6): 915-926.
- Mansfeld, J., P. Collin, M. O. Collins, J. S. Choudhary und J. Pines** (2011). APC15 drives the turnover of MCC-CDC20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nat Cell Biol* 13(10): 1234-1243.
- Margottin-Goguet, F., J. Y. Hsu, A. Loktev, H. M. Hsieh, J. D. Reimann und P. K. Jackson** (2003). Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell* 4(6): 813-826.
- Martinez, J. S., H. Hall, M. D. Bartolowits und M. C. Hall** (2012). Acm1 contributes to nuclear positioning by inhibiting Cdh1-substrate interactions. *Cell Cycle* 11(2): 384-394.
- Martinez, J. S., D. E. Jeong, E. Choi, B. M. Billings und M. C. Hall** (2006). Acm1 is a negative regulator of the CDH1-dependent anaphase-promoting complex/cyclosome in budding yeast. *Mol Cell Biol* 26(24): 9162-9176.
- McGarry, T. J. und M. W. Kirschner** (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93(6): 1043-1053.
- McGrath, D. A., E. R. Balog, M. Koivomagi, R. Lucena, M. V. Mai, A. Hirschi, . . . S. M. Rubin** (2013). Cks confers specificity to phosphorylation-dependent CDK signaling pathways. *Nat Struct Mol Biol* 20(12): 1407-1414.
- Melloy, P. G. und S. L. Holloway** (2004). Changes in the localization of the *Saccharomyces cerevisiae* anaphase-promoting complex upon microtubule depolymerization and spindle checkpoint activation. *Genetics* 167(3): 1079-1094.
- Mendenhall, M. D. und A. E. Hodge** (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(4): 1191-1243.
- Merz, K., M. Hondele, H. Goetze, K. Gmelch, U. Stoeckl und J. Griesenbeck** (2008). Actively transcribed rRNA genes in *S. cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes Dev* 22(9): 1190-1204.
- Miller, J. und C. Gordon** (2005). The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett* 579(15): 3224-3230.

- Miller, J. J., M. K. Summers, D. V. Hansen, M. V. Nachury, N. L. Lehman, A. Loktev und P. K. Jackson** (2006). Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev* 20(17): 2410-2420.
- Mimura, S., T. Seki, S. Tanaka und J. F. Diffley** (2004). Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature* 431(7012): 1118-1123.
- Mitchison, T. J. und E. D. Salmon** (2001). Mitosis: a history of division. *Nat Cell Biol* 3(1): E17-21.
- Mok, J., P. M. Kim, H. Y. Lam, S. Piccirillo, X. Zhou, G. R. Jeschke, . . . B. E. Turk** (2010). Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. *Sci Signal* 3(109): ra12.
- Moll, T., G. Tebb, U. Surana, H. Robitsch und K. Nasmyth** (1991). The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* 66(4): 743-758.
- Monecke, T., T. Guttler, P. Neumann, A. Dickmanns, D. Gorlich und R. Ficner** (2009). Crystal structure of the nuclear export receptor CRM1 in complex with Snurportin1 and RanGTP. *Science* 324(5930): 1087-1091.
- Morgan, D. O.** (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-291.
- Morgan, D. O.** (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control*. London, New Science Press.
- Morris, M. C., P. Kaiser, S. Rudyak, C. Baskerville, M. H. Watson und S. I. Reed** (2003). Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* 423(6943): 1009-1013.
- Moses, A. M., J. K. Heriche und R. Durbin** (2007). Clustering of phosphorylation site recognition motifs can be exploited to predict the targets of cyclin-dependent kinase. *Genome Biol* 8(2): R23.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Mumberg, D., R. Muller und M. Funk** (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res* 22(25): 5767-5768.
- Musacchio, A. und E. D. Salmon** (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 379-393.
- Muslin, A. J. und H. Xing** (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal* 12(11-12): 703-709.
- Nakajima, H., F. Toyoshima-Morimoto, E. Taniguchi und E. Nishida** (2003). Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J Biol Chem* 278(28): 25277-25280.
- Nash, P., X. Tang, S. Orlicky, Q. Chen, F. B. Gertler, M. D. Mendenhall, . . . M. Tyers** (2001). Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* 414(6863): 514-521.
- Naylor, S. G. und D. O. Morgan** (2014). Cdk1-dependent phosphorylation of Iqg1 governs actomyosin ring assembly prior to cytokinesis. *J Cell Sci* 127(Pt 5): 1128-1137.
- Neutznier, M.** (2003). Regulatoren des Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*: die Polo-Kinase Cdc5 und der Ubiquitinierungsfaktor Hct1. *Dissertation*, Universität Stuttgart.
- Nguyen, H. G., D. Chinnappan, T. Urano und K. Ravid** (2005). Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol Cell Biol* 25(12): 4977-4992.
- Nilsson, J., M. Yekezare, J. Minshull und J. Pines** (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat Cell Biol* 10(12): 1411-1420.
- O'Conallain, C., M. T. Doolin, C. Taggart, F. Thornton und G. Butler** (1999). Regulated nuclear localisation of the yeast transcription factor Ace2p controls expression of chitinase (CTS1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 262(2): 275-282.

- Oliveira, R. A. und K. Nasmyth** (2010). Getting through anaphase: splitting the sisters and beyond. *Biochem Soc Trans* 38(6): 1639-1644.
- Ollion, J., J. Cochenne, F. Loll, C. Escude und T. Boudier** (2013). TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* 29(14): 1840-1841.
- Ostapenko, D., J. L. Burton, R. Wang und M. J. Solomon** (2008). Pseudosubstrate inhibition of the anaphase-promoting complex by Acn1: regulation by proteolysis and Cdc28 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 28(15): 4653-4664.
- Pan, J. und R. H. Chen** (2004). Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 18(12): 1439-1451.
- Park, H. O. und E. Bi** (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(1): 48-96.
- Passmore, L. A., E. A. McCormack, S. W. Au, A. Paul, K. R. Willison, J. W. Harper und D. Barford** (2003). Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. *Embo J* 22(4): 786-796.
- Patra, D., S. X. Wang, A. Kumagai und W. G. Dunphy** (1999). The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem* 274(52): 36839-36842.
- Pereira, G., C. Manson, J. Grindlay und E. Schiebel** (2002). Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. *J Cell Biol* 157(3): 367-379.
- Perkins, G., L. S. Drury und J. F. Diffley** (2001). Separate SCF(CDC4) recognition elements target Cdc6 for proteolysis in S phase and mitosis. *EMBO J* 20(17): 4836-4845.
- Perzmaier, A. F., F. Richter und W. Seufert** (2013). Translation initiation requires cell division cycle 123 (Cdc123) to facilitate biogenesis of the eukaryotic initiation factor 2 (eIF2). *J Biol Chem* 288(30): 21537-21546.
- Pesin, J. A. und T. L. Orr-Weaver** (2008). Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 475-499.
- Peter, M. und I. Herskowitz** (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265(5176): 1228-1231.
- Peters, J. M.** (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(9): 644-656.
- Petroski, M. D. und R. J. Deshaies** (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1): 9-20.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng und T. E. Ferrin** (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25(13): 1605-1612.
- Pfleger, C. M. und M. W. Kirschner** (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14(6): 655-665.
- Pines, J.** (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1(3): E73-79.
- Pines, J.** (2006). Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol* 16(1): 55-63.
- Pines, J.** (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(7): 427-438.
- Pollard, T. D.** (2010). Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* 22(1): 50-56.
- Primorac, I. und A. Musacchio** (2013). Panta rhei: the APC/C at steady state. *J Cell Biol* 201(2): 177-189.
- Prinz, S., E. S. Hwang, R. Visintin und A. Amon** (1998). The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis. *Curr Biol* 8(13): 750-760.
- Qiao, R., F. Weissmann, M. Yamaguchi, N. G. Brown, R. VanderLinden, R. Imre, . . . J. M. Peters** (2016). Mechanism of APC/CCDC20 activation by mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(19): E2570-2578.
- Rape, M. und M. W. Kirschner** (2004). Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* 432(7017): 588-595.

- Rape, M., S. K. Reddy und M. W. Kirschner (2006). The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation. *Cell* 124(1): 89-103.
- Reimann, J. D., E. Freed, J. Y. Hsu, E. R. Kramer, J. M. Peters und P. K. Jackson (2001a). Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* 105(5): 645-655.
- Reimann, J. D., B. E. Gardner, F. Margottin-Goguuet und P. K. Jackson (2001b). Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes Dev* 15(24): 3278-3285.
- Reis, A., M. Levasseur, H. Y. Chang, D. J. Elliott und K. T. Jones (2006). The CRY box: a second APCcdh1-dependent degron in mammalian cdc20. *EMBO Rep* 7(10): 1040-1045.
- Reynard, G. J., W. Reynolds, R. Verma und R. J. Deshaies (2000). Cks1 is required for G(1) cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast. *Mol Cell Biol* 20(16): 5858-5864.
- Richardson, H., D. J. Lew, M. Henze, K. Sugimoto und S. I. Reed (1992). Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev* 6(11): 2021-2034.
- Rieder, C. L., R. W. Cole, A. Khodjakov und G. Sluder (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* 130(4): 941-948.
- Robbins, J. A. und F. R. Cross (2010a). Regulated degradation of the APC coactivator Cdc20. *Cell Div* 5: 23.
- Robbins, J. A. und F. R. Cross (2010b). Requirements and reasons for effective inhibition of the anaphase promoting complex activator CDH1. *Mol Biol Cell* 21(6): 914-925.
- Rock, J. M. und A. Amon (2009). The FEAR network. *Curr Biol* 19(23): R1063-1068.
- Ross, K. E., P. Kaldis und M. J. Solomon (2000). Activating phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclin-dependent kinase, cdc28p, precedes cyclin binding. *Mol Biol Cell* 11(5): 1597-1609.
- Rotin, D. und S. Kumar (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(6): 398-409.
- Rudner, A. D. und A. W. Murray (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol* 149(7): 1377-1390.
- Russell, P., S. Moreno und S. I. Reed (1989). Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell* 57(2): 295-303.
- Russo, A. A., P. D. Jeffrey und N. P. Pavletich (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* 3(8): 696-700.
- Sadowski, I., T. C. Su und J. Parent (2007). Disintegrator vectors for single-copy yeast chromosomal integration. *Yeast* 24(5): 447-455.
- Salazar, C. und T. Hofer (2009). Multisite protein phosphorylation--from molecular mechanisms to kinetic models. *FEBS J* 276(12): 3177-3198.
- Satyanarayana, A. und P. Kaldis (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28(33): 2925-2939.
- Schwab, M., A. S. Lutum und W. Seufert (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* 90(4): 683-693.
- Schwab, M., M. Neutzner, D. Mocker und W. Seufert (2001). Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *Embo J* 20(18): 5165-5175.
- Schwob, E., T. Bohm, M. D. Mendenhall und K. Nasmyth (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79(2): 233-244.
- Schwob, E. und K. Nasmyth (1993). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 7(7A): 1160-1175.
- Sedgwick, G. G., D. G. Hayward, B. Di Fiore, M. Pardo, L. Yu, J. Pines und J. Nilsson (2013). Mechanisms controlling the temporal degradation of Nek2A and Kif18A by the APC/C-Cdc20 complex. *EMBO J* 32(2): 303-314.
- Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer und R. Y. Tsien (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22(12): 1567-1572.

- Sheff, M. A. und K. S. Thorn** (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21(8): 661-670.
- Sherr, C. J. und J. M. Roberts** (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13(12): 1501-1512.
- Shirayama, M., A. Toth, M. Galova und K. Nasmyth** (1999). APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* 402(6758): 203-207.
- Shirayama, M., W. Zachariae, R. Ciosk und K. Nasmyth** (1998). The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 17(5): 1336-1349.
- Shteinberg, M., Y. Protopopov, T. Listovsky, M. Brandeis und A. Hershko** (1999). Phosphorylation of the cyclosome is required for its stimulation by Fizzy/cdc20. *Biochem Biophys Res Commun* 260(1): 193-198.
- Sidorova, J. M., G. E. Mikesell und L. L. Breeden** (1995). Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization. *Mol Biol Cell* 6(12): 1641-1658.
- Sikorski, R. S. und P. Hieter** (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122(1): 19-27.
- Sironi, L., M. Mapelli, S. Knapp, A. De Antoni, K. T. Jeang und A. Musacchio** (2002). Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO J* 21(10): 2496-2506.
- Sivakumar, S. und G. J. Gorbsky** (2015). Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16(2): 82-94.
- Skaar, J. R., J. K. Pagan und M. Pagano** (2013). Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(6): 369-381.
- Skowyra, D., K. L. Craig, M. Tyers, S. J. Elledge und J. W. Harper** (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91(2): 209-219.
- Songyang, Z., S. Blechner, N. Hoagland, M. F. Hoekstra, H. Piwnica-Worms und L. C. Cantley** (1994). Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol* 4(11): 973-982.
- Stegmeier, F. und A. Amon** (2004). Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet* 38: 203-232.
- Stegmeier, F., M. Rape, V. M. Draviam, G. Nalepa, M. E. Sowa, X. L. Ang, . . . S. J. Elledge** (2007). Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature* 446(7138): 876-881.
- Strausfeld, U., J. C. Labbe, D. Fesquet, J. C. Cavadore, A. Picard, K. Sadhu, . . . M. Doree** (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 351(6323): 242-245.
- Stuart, D. und C. Wittenberg** (1995). CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev* 9(22): 2780-2794.
- Sullivan, M. und D. O. Morgan** (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11): 894-903.
- Summers, M. K., B. Pan, K. Mukhyala und P. K. Jackson** (2008). The unique N terminus of the UbcH10 E2 enzyme controls the threshold for APC activation and enhances checkpoint regulation of the APC. *Mol Cell* 31(4): 544-556.
- Swaney, D. L., P. Beltrao, L. Starita, A. Guo, J. Rush, S. Fields, . . . J. Villen** (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods* 10(7): 676-682.
- Taberner, F. J., I. Quilis und J. C. Igual** (2009). Spatial regulation of the start repressor Whi5. *Cell Cycle* 8(18): 3010-3018.
- Teixeira, L. K. und S. I. Reed** (2013). Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu Rev Biochem* 82: 387-414.
- Thomson, M. und J. Gunawardena** (2009). Unlimited multistability in multisite phosphorylation systems. *Nature* 460(7252): 274-277.

- Thornton, B. R. und D. P. Toczyski** (2003). Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nat Cell Biol* 5(12): 1090-1094.
- Tian, W., B. Li, R. Warrington, D. R. Tomchick, H. Yu und X. Luo** (2012). Structural analysis of human Cdc20 supports multisite degron recognition by APC/C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(45): 18419-18424.
- Tomko, R. J., Jr. und M. Hochstrasser** (2013). Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem* 82: 415-445.
- Topper, L. M., M. S. Campbell, S. Tugendreich, J. R. Daum, D. J. Burke, P. Hieter und G. J. Gorbsky** (2002). The dephosphorylated form of the anaphase-promoting complex protein Cdc27/Apc3 concentrates on kinetochores and chromosome arms in mitosis. *Cell Cycle* 1(4): 282-292.
- Trunnell, N. B., A. C. Poon, S. Y. Kim und J. E. Ferrell, Jr.** (2011). Ultrasensitivity in the Regulation of Cdc25C by Cdk1. *Mol Cell* 41(3): 263-274.
- Tschochner, H. und E. Hurt** (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13(5): 255-263.
- Tyers, M., G. Tokiwa und B. Futcher** (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J* 12(5): 1955-1968.
- Tyers, M., G. Tokiwa, R. Nash und B. Futcher** (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J* 11(5): 1773-1784.
- Ubersax, J. A., E. L. Woodbury, P. N. Quang, M. Paraz, J. D. Blethrow, K. Shah, . . . D. O. Morgan** (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425(6960): 859-864.
- Ueta, R., N. Fujiwara, K. Iwai und Y. Yamaguchi-Iwai** (2007). Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18(8): 2980-2990.
- Uhlmann, F., F. Lottspeich und K. Nasmyth** (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400(6739): 37-42.
- Uhlmann, F., D. Wernic, M. A. Poupart, E. V. Koonin und K. Nasmyth** (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103(3): 375-386.
- Uzunova, K., B. T. Dye, H. Schutz, R. Ladurner, G. Petzold, Y. Toyoda, . . . J. M. Peters** (2012). APC15 mediates CDC20 autoubiquitylation by APC/C(MCC) and disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Nat Struct Mol Biol* 19(11): 1116-1123.
- Van Voorhis, V. A. und D. O. Morgan** (2014). Activation of the APC/C Ubiquitin Ligase by Enhanced E2 Efficiency. *Curr Biol* 24(13): 1556-1562.
- Verma, R., R. S. Annan, M. J. Huddleston, S. A. Carr, G. Reynard und R. J. Deshaies** (1997). Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science* 278(5337): 455-460.
- Versele, M. und J. Thorner** (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol* 15(8): 414-424.
- Visintin, C., B. N. Tomson, R. Rahal, J. Paulson, M. Cohen, J. Taunton, . . . R. Visintin** (2008). APC/C-Cdh1-mediated degradation of the Polo kinase Cdc5 promotes the return of Cdc14 into the nucleolus. *Genes Dev* 22(1): 79-90.
- Visintin, R., K. Craig, E. S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers und A. Amon** (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2(6): 709-718.
- Visintin, R., E. S. Hwang und A. Amon** (1999). Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* 398(6730): 818-823.
- Visintin, R., S. Prinz und A. Amon** (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 278(5337): 460-463.
- Vodermaier, H. C., C. Gieffers, S. Maurer-Stroh, F. Eisenhaber und J. M. Peters** (2003). TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr Biol* 13(17): 1459-1468.
- Wagner, M. V., M. B. Smolka, R. A. de Bruin, H. Zhou, C. Wittenberg und S. F. Dowdy** (2009). Whi5 regulation by site specific CDK-phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 4(1): e4300.

- Waizenegger, I. C., S. Hauf, A. Meinke und J. M. Peters** (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103(3): 399-410.
- Wan, Y. und M. W. Kirschner** (2001). Identification of multiple CDH1 homologues in vertebrates conferring different substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23): 13066-13071.
- Wang, W. und M. W. Kirschner** (2013). Emi1 preferentially inhibits ubiquitin chain elongation by the anaphase-promoting complex. *Nat Cell Biol* 15(7): 797-806.
- Wäsch, R. und F. R. Cross** (2002). APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* 418(6897): 556-562.
- Waterhouse, A. M., J. B. Procter, D. M. Martin, M. Clamp und G. J. Barton** (2009). Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9): 1189-1191.
- Wegerer, A.** (2004). Funktionelle Domänen von Mitoseregulatoren in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation*, Universität Stuttgart.
- Wei, W., N. G. Ayad, Y. Wan, G. J. Zhang, M. W. Kirschner und W. G. Kaelin, Jr.** (2004). Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 428(6979): 194-198.
- Widlund, P. O., J. S. Lyssand, S. Anderson, S. Niessen, J. R. Yates, 3rd und T. N. Davis** (2006). Phosphorylation of the chromosomal passenger protein Bir1 is required for localization of Ndc10 to the spindle during anaphase and full spindle elongation. *Mol Biol Cell* 17(3): 1065-1074.
- Wittner, M., S. Hamperl, U. Stockl, W. Seufert, H. Tschochner, P. Milkereit und J. Griesenbeck** (2011). Establishment and maintenance of alternative chromatin states at a multicopy gene locus. *Cell* 145(4): 543-554.
- Wolthuis, R., L. Clay-Farrace, W. van Zon, M. Yekezare, L. Koop, J. Ogink, . . . J. Pines** (2008). Cdc20 and Cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of cyclin A. *Mol Cell* 30(3): 290-302.
- Woodbury, E. L. und D. O. Morgan** (2007). Cdk and APC activities limit the spindle-stabilizing function of Fin1 to anaphase. *Nat Cell Biol* 9(1): 106-112.
- Wu, T., Y. Merbl, Y. Huo, J. L. Gallop, A. Tzur und M. W. Kirschner** (2010). UBE2S drives elongation of K11-linked ubiquitin chains by the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4): 1355-1360.
- Wurzenberger, C. und D. W. Gerlich** (2011). Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(8): 469-482.
- Yamamoto, A., V. Guacci und D. Koshland** (1996). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 133(1): 85-97.
- Yeong, F. M., H. H. Lim, C. G. Padmashree und U. Surana** (2000). Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20. *Mol Cell* 5(3): 501-511.
- Yeong, F. M., H. H. Lim, Y. Wang und U. Surana** (2001). Early expressed Clb proteins allow accumulation of mitotic cyclin by inactivating proteolytic machinery during S phase. *Mol Cell Biol* 21(15): 5071-5081.
- Yudkovsky, Y., M. Shteinberg, T. Listovsky, M. Brandeis und A. Hershko** (2000). Phosphorylation of Cdc20/fizzy negatively regulates the mammalian cyclosome/APC in the mitotic checkpoint. *Biochem Biophys Res Commun* 271(2): 299-304.
- Zachariae, W., M. Schwab, K. Nasmyth und W. Seufert** (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282(5394): 1721-1724.
- Zachariae, W., T. H. Shin, M. Galova, B. Obermaier und K. Nasmyth** (1996). Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 274(5290): 1201-1204.
- Zhang, S., L. Chang, C. Alfieri, Z. Zhang, J. Yang, S. Maslen, . . . D. Barford** (2016). Molecular mechanism of APC/C activation by mitotic phosphorylation. *Nature* 533(7602): 260-264.

- Zhang, Y. und E. Lees** (2001). Identification of an overlapping binding domain on Cdc20 for Mad2 and anaphase-promoting complex: model for spindle checkpoint regulation. *Mol Cell Biol* 21(15): 5190-5199.
- Zhou, Y., Y. P. Ching, A. C. Chun und D. Y. Jin** (2003a). Nuclear localization of the cell cycle regulator CDH1 and its regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 278(14): 12530-12536.
- Zhou, Y., Y. P. Ching, R. W. Ng und D. Y. Jin** (2003b). Differential expression, localization and activity of two alternatively spliced isoforms of human APC regulator CDH1. *Biochem J* 374(Pt 2): 349-358.
- Zielke, N., S. Querings, C. Rottig, C. Lehner und F. Sprenger** (2008). The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is required for rereplication control in endoreplication cycles. *Genes Dev* 22(12): 1690-1703.
- Zur, A. und M. Brandeis** (2001). Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *Embo J* 20(4): 792-801.

8 ANHANG

8.1 Ergänzende Abbildungen

Sc_Cdh1 1 - - - - - MSTNLNPFMNNTPSSSP LKGSESKRVRSKRP I SSSS 35
Sp_Cdh1 1 - - - - - MDEFDGFTRPTSSNSSANRNSNNSMNRVENNNNSN 34
Dm_Cdh1 1 - - - - - MFSPPEYQKRILKHYS - - - - - PVARNLFNNFES 27
Xl_Cdh1 1 - - - - - MDQDYERRLLRQ I NQINQENTIPCASEMRRTLTP 33
Hs_Cdh1 1 - - - - - MDQDYERRLLRQ I V I QNENTMTPRVTEMRRTLTP 33
Sc_Cdc20 1 - - - - - MPRESSRDKGNAAI SGNRSVLS - - IASPTKLNILSSDWSRNQGVSKN 45
Sp_Cdc20 1 - - - - - MEIAGNSSTISPTFSTPTKKNRNVFPNSPIPLHQQA 37
Dm_Cdc20 1 - - - - - MSQFNFVSDLQNALIMDG - ETRGPAPRWKKKLEA 33
Xl_Cdc20 1 - - - - - MAQFAFETDINSILKLDTPITNAPLARWQRKAKE 34
Hs_Cdc20 1 - - - - - MAQFAFESDLHSLQLDAPIPNAPPARWQRKAKE 34

Sc_Cdh1 36 SAS - - - - - LLSSPSRRSRPSTVYGDRIIPSRDIDFNSIVS - - - 71
Sp_Cdh1 35 SDSANTVDSRGDAHTRMRQGFEKSFSSPN-KKRPRTNEGDRFIIPSRD-ASTELWTG - - - 89
Dm_Cdh1 28 STT - - - - - PTS - - - - - LDRFIIPCR - - AYNWQTN - - - 49
Xl_Cdh1 34 TNS - - - - - PMSSP - - - - - SKHGDRFIIPSR - - AGANWSIN - - - 60
Hs_Cdh1 34 ASS - - - - - PVSSP - - - - - SKHGDRFIIPSR - - AGANWSVN - - - 60
Sc_Cdc20 46 SLKRSSS - - - - - LNIRNSKRPSLQASANSIYSRPKITIGAPPLIRRDSS 89
Sp_Cdc20 38 LLGRNG - - - - - RSSKRCSPKSSF - - IRNSPKIDVNV - - - 66
Dm_Cdc20 34 SLNG - - - - - SVNTTRSVLSVSYSNTSFGVQAPTPTPGKSSSEG - - - 70
Xl_Cdc20 35 GNCSLNT - - - - - SANTSTMSPMKT - NRSHSSKTPSKTPGKSGQ - - - 73
Hs_Cdc20 35 AAG - - - - - PAPSPMRAA - NRSHSAGRTPGRTPGKSSS - - - 65

Sc_Cdh1 72 - - - - - ISSMASVPALNPSSSTEDQVE - - - YQKERGAHE 100
Sp_Cdh1 90 - - - - - PLTPVK - - - - - PLTPVK - - - - - KKQSVADR 109
Dm_Cdh1 50 - - - - - FASINKSNDNSPQTSKK - - - - - QRDCG - ET 73
Xl_Cdh1 61 - - - - - FHRINE - NEKSPSQNRK - - - - - AKDATADS 84
Hs_Cdh1 61 - - - - - FHRINE - NEKSPSQNRK - - - - - AKDATSDN 84
Sc_Cdc20 90 FFKDEFDAKKDKATFSAYSSRSYPTIGSESVVSQTLSQPTTSREVDQFTVAADRYIPIL 150
Sp_Cdc20 67 - - - - - TDWSIPLCGS - - - - - PRNKSPPASR - - - - - SDRFIIPSR 94
Dm_Cdc20 71 - - - - - KTKKSNTTPSKTPG - - - - - GGDRFIIPNR 93
Xl_Cdc20 74 - - - - - KMQGTPSRA - - - - - GGDRFIIPNR 91
Hs_Cdc20 66 - - - - - KVQTTPSKP - - - - - GGDRFIIPHR 83

Sc_Cdh1 101 TYNTLLKNELFGEMLSKDVTG - - - - - SESSI DRIKNTRPSTRGNVHAEN 144
Sp_Cdh1 110 NFTTLLRSELFGSND - - ETFNNSPIATPNTTIGVSTPRTDSGIDDIELTQRTPPSSSHTSS 168
Dm_Cdh1 74 ARDSLAYSCLLKN - - - ELLG - - - - - SAIDVKTAG - EERNENAYTP 110
Xl_Cdh1 85 GKDGGLAYSALLKN - - - ELLG - - - - - AGIEKVQDPQTEDRRLLQPSTP 122
Hs_Cdh1 85 GKDGGLAYSALLKN - - - ELLG - - - - - AGIEKVQDPQTEDRRLLQPSTP 122
Sc_Cdc20 151 QGASQNKVDPETLHE - - - - - ALPPPNASPI SHLRAQTKIVFKQNVAAE 193
Sp_Cdc20 95 PNTANAFVN - - - - - SISSDVPFDYSESVAE 140
Dm_Cdc20 94 AATNFELAHFLVNKDSGDKSDEEN - - - - - DKATSSNSNESNVQASAHKGDRQLISEV 126
Xl_Cdc20 92 SAMQMDVASFLLSKE - - - - - NEPTDT - SPTKKEQQKAWAMN 126
Hs_Cdc20 84 SAAQMEVASFLLSKE - - - - - NQPENSQTPTKKEHQKAWALN 119

Sc_Cdh1 145 TTRHG - YELERVSTPPPEAAGLEEFSPHSTPVTPRRLFTSQQDEITRPSSNSVRGASLLTY 204
Sp_Cdh1 169 SILQ - - - - - NTPVTPSRKIFHYLSPDRNKSSYGKKAQ - - - Y 202
Dm_Cdh1 111 A - - - - - AKRSLFKYQSP - - - - - TKQ - - - - - 125
Xl_Cdh1 123 - - - - - EKSLFTYLS - - - - - SKRAS - - - P 139
Hs_Cdh1 123 - - - - - EKSLFTYLS - - - - - SKRAS - - - P 139
Sc_Cdc20 194 CGLDMN - - - - - KRILQYMPE - - - - - P 209
Sp_Cdc20 121 CGFDLN - - - - - TRVLAFKLD - - - - - A 136
Dm_Cdc20 147 AQVGD - - - - - SKGGRILCYQNK - - - - - A 164
Xl_Cdc20 127 LNGFD - - - - - MEEAKILRLGGR - - - - - P 144
Hs_Cdc20 120 LNGFD - - - - - VEEAKILRLSGK - - - - - P 137

Sc_Cdh1 205 QQRKGRRLSAASLLQSQFFDSMSPVRPDSKQLLLSPGKQFRQIAKVPYRVLDAPLADDFY 265
Sp_Cdh1 203 QDNPNRTI - - - - - YSLSPVRSITKDLISASRLEGRELPSIPYRVLDAPLAGDFY 252
Dm_Cdh1 126 - DYNGECP - - - - - YSLSPVSAKSQKLLRSPRKATRKISRIPIFKVLDAPELQDDFY 174
Xl_Cdh1 140 DDGNEVSP - - - - - YSLSPVSNKSQKLLRSPRKPTRKISKIPFKVLDAPELQDDFY 189
Hs_Cdh1 140 DDGNEVSP - - - - - YSLSPVSNKSQKLLRSPRKPTRKISKIPFKVLDAPELQDDFY 189
Sc_Cdc20 210 PKCSSLRQKS - - - - - YIMKKRTHYSYQQEQKIPDLIKLRKINTNPERILDAPGFQDDFY 263
Sp_Cdc20 137 PEAKKP - - - - - VDLRTQHNRPRQPVVTP - - AKRRFNTTTPERVLDAPGIIDYY 182
Dm_Cdc20 165 PAAPETHNN - - - - - PLKVYYSIK - TPISTK - SGSRYIPTTSEIRILDAPDFINDYY 212
Xl_Cdc20 145 QNAPEGYQN - - - - - NLKVLYSQKNTPGSSK - KTGRIIPSPMDRVLDAPIRNDYY 193
Hs_Cdc20 138 QNAPEGYQN - - - - - RLKVLYSQKATPGSSR - KTCRYIPSLPDRILDAPDIRNDYY 193

Sc_Cdh1	266	YSLIDWSSTDLAVALGKSI	FLTDNNTGDV	VHLC	DTEN	- - - EYTSLSWIGAGSHLAVGQAN	323	
Sp_Cdh1	253	LNLLDWGQC	NMLAVALASRVYLWSG	ISSEVTVMHNFYP	- TDTVTSLRWVQRGTHLAVGTHN		312	
Dm_Cdh1	175	LNLVDWSSQ	NVLAVGLGSCVYLWSACT	SQVTRL	CDLSPDANTVT	SVSWNERGNTVAVGTHH	235	
Xl_Cdh1	190	LNLVDWSSL	NVLAVGLGTCVYLWSACT	SQVTRL	CDLSVEGDSVT	SVGWSEGRNLVAVGTHK	250	
Hs_Cdh1	190	LNLVDWSSL	NVLAVGLGTCVYLWSACT	SQVTRL	CDLSVEGDSVT	SVGWSEGRNLVAVGTHK	250	
Sc_Cdc20	264	LNLLSWSKKN	VLAIALDATALYLNATTG	DVSLTDFEN	- TTICS - VTWSDDDCHISIGKED		322	
Sp_Cdc20	183	LNLLDWSNL	NVVAVALERNVYVWNA	DGSSVSALAETDESTYVAS	- VKWSHDGSFLSVGLGN		242	
Dm_Cdc20	213	LNLMDWSAD	NI VAVALGSCVYLWNAQT	GNI EQLTEFEE	- GDYAGSLSWIQEGQILAIGNST		272	
Xl_Cdc20	194	LNLIDWSSQ	NALAVALNDSVYLWNYAT	GDIILL	LQMENSEEYISSVSWIKEGHFLAVGTSS		254	
Hs_Cdc20	187	LNLVDWSSG	NVLAVALDNSVYLWSASSG	DILQL	LQMEQPGEYISSVAWIKEGNYLAVGTSS		247	
Sc_Cdh1	324	GLVEIYDVM	KRKCIRTL	- SGHIDRVACL	SWNNHVLTSGSRDHR	ILHRDVRMP-DPFFETIE	382	
Sp_Cdh1	313	GSVEIWDAA	TCKKTRTM	- SGHTERVGAL	SWNDHVLSSGGRDNH	ILHRDVRAP-EHYFRVLT	371	
Dm_Cdh1	236	GYVTVWD	VAAANKQINKL	- NGHSARVGAL	AWNSDILSSGSRDRW	IQRDTRTPQLQSERRLA	295	
Xl_Cdh1	251	GFVQIWDAS	AGKKLSTL	- EGHTARVGAL	AWNADQLSSGSRDRM	ILQRDIRTPPVQSERRLQ	310	
Hs_Cdh1	251	GFVQIWDAA	AGKKLSML	- EGHTARVGAL	AWNAEQLSSGSRDRM	ILQRDIRTPPLQSERRLQ	310	
Sc_Cdc20	323	GNTIWDVET	MSLIRTMRSGLGVRIG	SLSWLDTLIATGSRSGE	IQINDVRIK-QHIVSTWA		382	
Sp_Cdc20	243	GLVDIYD	VESQTKLRTM	- AGHQARVGCL	SWNRHVLSSGSRSGA	IHHHDVRIA-NHQIGTLQ	301	
Dm_Cdc20	273	GAVELWDC	SKVKRLRVM	- DGHSARVGSL	AWNSFLVSSGSRDGT	IVHHDVRRAR-EHKLSTLS	331	
Xl_Cdc20	255	SEVQLWDV	QQQKRLRNM	- ISHSSRVGAL	SWNNHILSSGSRGTGH	IHHHDVRA-QHHVSTLT	313	
Hs_Cdc20	248	AEVQLWDV	QQQKRLRNM	- TSHSARVGSL	SWNSYILSSGSRSGH	IHHHDVRA-EHHVATLS	306	
Sc_Cdh1	383	SHTQEVCG	LKWNVADNK	LASGGNDN	VVHVYEGTSK	- - - - - SPILTFDEHKA	AAVKAMAWSP 437	
Sp_Cdh1	372	AHRQEVCG	LEWNSNENL	LASGGNDN	ALMVWDKFE	- - - - - KPLYSFHHI	AAVKAITWSP 426	
Dm_Cdh1	296	GHRQEVCG	LKWSPDNQYL	LASGGNDN	NRLYVWNQHSV	- - - - - NPVQSYTEH	MAAVKAIWSP 350	
Xl_Cdh1	311	GHRQEVCG	LKWSTDHQL	LASGGNDN	NKLLVWNHSSL	- - - - - SPVQQYTEH	LAAVKAIWSP 365	
Hs_Cdh1	311	GHRQEVCG	LKWSTDHQL	LASGGNDN	NKLLVWNHSSL	- - - - - SPVQQYTEH	LAAVKAIWSP 365	
Sc_Cdc20	383	EHTGEVCG	LSYKSDGLQL	LASGGNDN	TMVIMQDTRTS	- - - - - LPQFSKKTHT	AAVKALSWCP 437	
Sp_Cdc20	302	GHSSEVCG	LAWRS DGLQL	LASGGNDN	VVQIWDARSS	- - - - - IPKFTKTNNH	AAVKA VAWCP 356	
Dm_Cdc20	332	GHTQEVCG	LKWSTDFKYL	LASGGNDN	LVNVWSAASGGVGTATD	PLHKFNDHQA	AVRALAWCP 392	
Xl_Cdc20	314	GHTQEVCG	LKWSPDGRYL	LASGGNDN	LVNVWPCVQG	- DSGEFS	SPVQTFTHQGA	AVKAVAWCP 373
Hs_Cdc20	307	GHSQEVCG	LRAWPDGRHL	LASGGNDN	LVNVWPSAPG	- EGG-WVPLQTF	THQGA	AVKAVAWCP 365
Sc_Cdh1	438	HKRGVLA	TGGGTADRR	LKIWNVNTS	IKMSDIDSGSQ	ICNMVWSK	- - - - - NTNELVTS 489	
Sp_Cdh1	427	HQRGILA	SGGTADRT	IKLWNTQ	RGSMLHNI	DTGSQVCNLLWSK	- - - - - QTNEFIST 478	
Dm_Cdh1	351	HHHGLLA	SGGTADRC	IRFWNTLT	TGQPMQCV	DTGSQVCNLAWSK	- - - - - HSELVST 402	
Xl_Cdh1	366	HQHGLLA	SGGTADRC	IRFWNTLT	TGQPLQCI	DTGSQVCNLAWSK	- - - - - HANELVST 417	
Hs_Cdh1	366	HQHGLLA	SGGTADRC	IRFWNTLT	TGQPLQCI	DTGSQVCNLAWSK	- - - - - HANELVST 417	
Sc_Cdc20	438	YSPNILA	SGGGQTDKHI	HFWNSIT	GARVGS	INTGSQVSSLHWGQSHTSTNGGMMNKE	IVAT 498	
Sp_Cdc20	357	WQSNLLA	TGGGTMDKQI	HFWNAAT	GARVNTV	DAGSQVTSLIWSP	- - - - - HSKEIMST 408	
Dm_Cdc20	393	WQPSTLA	SGGTADRC	IKFWNVNNGT	LMKSVDSKSQVCSLLFSR	- - - - - HYKELISA	444	
Xl_Cdc20	374	WQSNVLA	TGGGTSRHI	RIWNVCSGT	CLNSVDTHSQVCSILWSA	- - - - - NYKELISG	425	
Hs_Cdc20	366	WQSNVLA	TGGGTSRHI	RIWNVCSG	ACL SAVDAHSQVCSILWSP	- - - - - HYKELISG	417	
Sc_Cdh1	490	HGYSKYNL	TLWDCNS	- - MDP	IAILKGHSFRVL	HLTL	SNDGTTVVSGAGDETLRYWKL	FDK - 547
Sp_Cdh1	479	HGFME	NEVALWNYPS	- - VSRVGT	LKGHTDRVLYLAMSP	NGENIVTGA	ADETLRFWKL	FD - 535
Dm_Cdh1	403	HGYSQ	NQILVWKYPS	- - LTQVAKLT	GHYSRVLYLALSPDGEA	IVTGAGDETL	RFWNVFSK	- 460
Xl_Cdh1	418	HGYSQ	NQILVWKYPS	- - LTQVAKLT	GHYSRVLYLAMSPDGEA	IVTGAGDETL	RFWNVFSK	- 475
Hs_Cdh1	418	HGYSQ	NQILVWKYPS	- - LTQVAKLT	GHYSRVLYLAMSPDGEA	IVTGAGDETL	RFWNVFSK	- 475
Sc_Cdc20	499	GGNPENAI	SVNYETKFKVAEV	- VHAHEAR	ICCSQLSPDGT	TTLATVGGDENL	KFYKIEDPR	558
Sp_Cdc20	409	HGF	PDNLSIWSYSSSGLTKQVD	IPADHTRVLYSALSPDGRIL	STAASDENL	KFWRVYDG	- 468	
Dm_Cdc20	445	HGF	ANNQLTIWKYPT	- - MVKQADLT	GHTSRVLYQAMSPDGSTV	I	SAGADETLRLWNC	FAP - 502
Xl_Cdc20	426	HGFA	QNQLVLWKYPT	- - MTRVSEL	KGHTARVLNLAMSPDGCT	VASAAADETLRLWKC	FEV - 483	
Hs_Cdc20	418	HGFA	QNQLVIWKYPT	- - MAKVAEL	KGHTSRVLSLTMSPDGAT	VASAAADETLRLWRC	FEL - 475	
Sc_Cdh1	548	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- PKAKVQ	- - PNSL	IFDAFNQIR	566
Sp_Cdh1	536	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- SKSKHS	ASTMSSP	FDPTMKIR	556
Dm_Cdh1	461	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- ARSQK	- - ENKSVL	NLFANIR	478
Xl_Cdh1	476	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- TRSTK	- - - ES	SVLNLFTIR	493
Hs_Cdh1	476	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- TRSTK	VKWESV	SVLNLFTIR	496
Sc_Cdc20	559	CTGRS	REDGLMDGMLGL	IGKEG	CRTNDKENRSKNSE	I	HTRRPSSTSQYLIR	610
Sp_Cdc20	469	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- DHVKR	P I P - - -	- ITKTPSSS - -	ITIR 488
Dm_Cdc20	503	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- DPLASK	KAVSTSKGKQSV	FRQSIR	526
Xl_Cdc20	484	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- DPVT	KKEKEKSRSSKS	- I IHQSIR	506
Hs_Cdc20	476	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- DPARRR	EREKASAAKSSL	IHQGIR	499

C-Box

MIM

WD40

IR

● KEN-Box-Rezeptor

● D-Box-Rezeptor

Abbildung 8.1: Sequenzvergleich von APC/C-Aktivatoren aus verschiedenen Spezies

Die Aminosäuresequenzen der Aktivatoren Cdh1 und Cdc20 aus verschiedenen Spezies wurde mit Hilfe des Programms Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009) und dem ClustalW-Algorithmus angeordnet. Der Grad der Konservierung der Aminosäuren wird durch die Intensität der Blaufärbung widerspiegelt. Mit Hilfe von farbigen Rahmen sind die Positionen der C-Box (blau), des Mad2-Interaktionsmotivs (MIM, lila), der WD40-

Domäne (grau) und des IR-Motivs (rot) hervorgehoben. Die grünen und orangenen Punkte unter den Sequenzen markieren Aminosäuren, die Bestandteil des KEN- bzw D-Box-Rezeptors sind (basierend auf Chao *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012; He *et al.*, 2013). Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an.

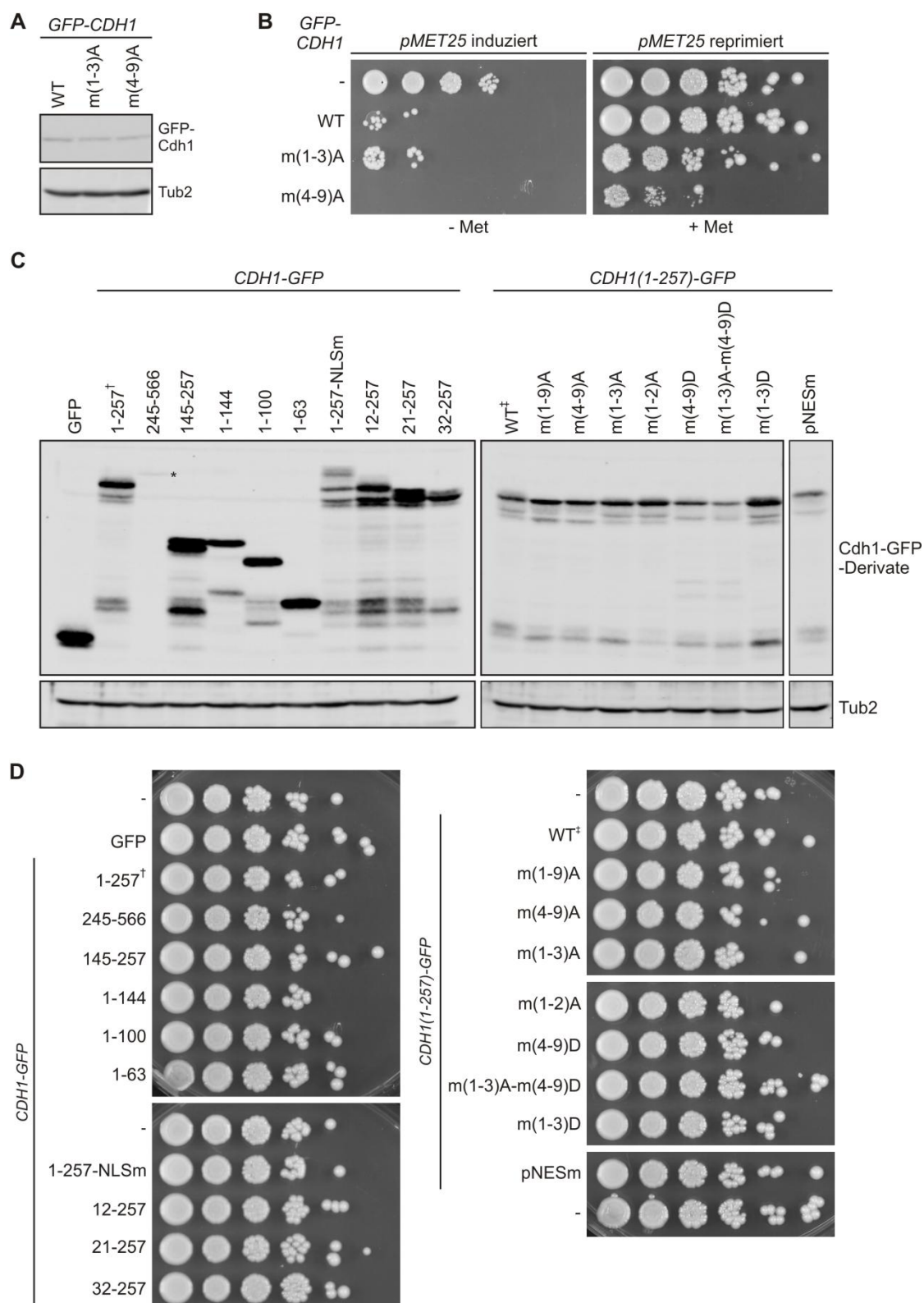


Abbildung 8.2: Expressionslevel der GFP-Cdh1-Fusionskonstrukte und ihr Einfluss auf das Zellwachstum

(A) Westernblot-Analyse zur Expression von *GFP-CDH1*, *GFP-CDH1-m(1-3)A* oder *GFP-CDH1-m(4-9)A* in asynchron wachsenden Zellen. Die Expression der Konstrukte von dem induzierbaren *MET25*-Promotor wurde durch Kultivieren der Zellen in Selektivmedium ohne Methionin für 90 min induziert. Anschließend wurden Proteinrohextrakte hergestellt und die GFP-Cdh1-Fusionsproteine wurden mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers in der Westernblot-Analyse detektiert. Tubulin (Tub2) wurde als Ladekontrolle mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen. **(B)** Zellwachstum nach Überexpression *GFP-CDH1*, *GFP-CDH1-m(1-3)A*

oder *GFP-CDH1-m(4-9)A* von dem induzierbaren *MET25*-Promotor. Die Zellen wurden in flüssigem Vollmedium (XYD) bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurden die Stämme in Form einer Verdünnungsreihe mit 1:10-Schritten ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml auf entweder Vollmediumsplatten (XYD; reprimierende Bedingung) oder Selektionsplatten ohne Methionin (SD-Met, induzierende Bedingung) getropft und 48 h bei 30°C inkubiert. Als Kontrolle diente ein Stamm, der kein *GFP-CDH1*-Konstrukt exprimiert. **(C)** Westernblot-Analyse zur Expression der *CDH1-GFP*-Konstrukte in asynchron wachsenden Zellen. Die Expression der Fusionskonstrukte erfolgte von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor. Der Nachweis der Fusionsproteine sowie von Tubulin (Tub2), das als Ladekontrolle diente, wurden wie in A durchgeführt. **(D)** Zellwachstum nach Überexpression der *CDH1-GFP*-Fusionskonstrukte von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor. Die Zellen wurden in Flüssigmedium bis zur stationären Phase kultiviert und anschließend in Form einer Verdünnungsreihe mit 1:10-Schritten ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml auf eine Glukose-haltige Vollmediumsplatte (XYD) getropft und 48 h bei 30°C inkubiert. Als Kontrolle diente ein Stamm, der kein *CDH1-GFP*-Konstrukt exprimiert. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

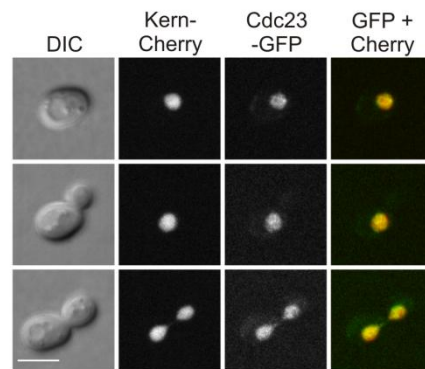


Abbildung 8.3: Lokalisation von Cdc23-GFP

Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die eine endogen mit GFP-markierte Version der APC/C-Untereinheit Cdc23 exprimierten. Es sind repräsentative Zellen der G1-Phase (obere Bildreihe) oder der Mitose gezeigt, die sich entweder vor der Anaphase (mittlere Bildreihe) oder in der späten Anaphase (untere Bildreihe) befinden. Die Stämme co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast.

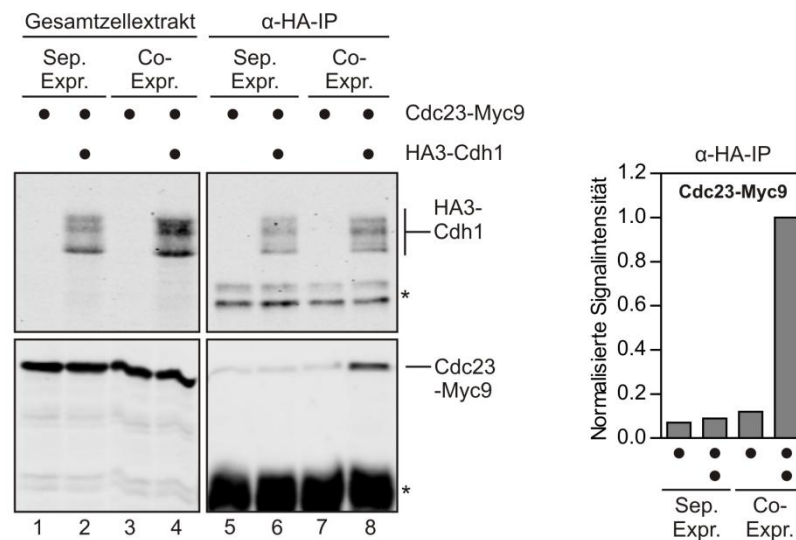


Abbildung 8.4: Interaktion von APC/C und Cdh1 in CoIP-Experimenten nach Co-Expression und getrennter Expression

Westernblot-Analyse zur Interaktion von HA3-Cdh1 und Cdc23-Myc9 nach getrennter Expression oder Co-Expression der Interaktionspartner. Endogen mit einem Myc9-Epitop markiertes *CDC23* (*CDC23-MYC9*) und *HA3-CDH1*, dessen Expression von dem *GALL*-Promotor für 2 h induziert wurde, wurden entweder in zwei haploiden Stämmen getrennt exprimiert (Spuren 2 und 6) oder in einem heterozygot diploiden Stamm co-exprimiert (Spuren 4 und 8). Im Fall der getrennten Expression wurden die Stämme vor dem Zellaufschluss zu gleichen Anteilen gemischt. Nach dem Zellaufschluss wurde HA3-Cdh1 mit Hilfe eines HA-spezifischen Antikörpers aus dem Gesamtzellextrakt immunpräzipitiert. HA3-Cdh1 und Cdc23-Myc9 wurden in den Gesamtzellextrakten und in den Immunpräzipitaten (α-HA-IP) mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung eines HA- und Myc-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Als Negativkontrolle für die getrennten Expression der Bindungspartner wurde der Stamm, der *CDC23-MYC9* exprimierte, mit einem haploiden Wildtyp-Stamm (K699) gemischt (Spuren 1 und 5). Im Fall der Co-Expression diente ein Stamm, der heterozygot diploid für das *CDC23-MYC9*-Konstrukt war aber kein *HA3-CDH1* enthielt, als Negativkontrolle (Spuren 3 und 7). Die Sternchen markieren das Signal des für die IP verwendeten HA-spezifischen Antikörpers. Das Säulendiagramm zeigt die Quantifizierung der Cdc23-Myc9-Signale in den Immunpräzipitaten. Die Signalintensität des Immunpräzipitats nach Co-Expression wurde gleich 1 gesetzt. Verändert nach Höckner *et al.*, 2016.

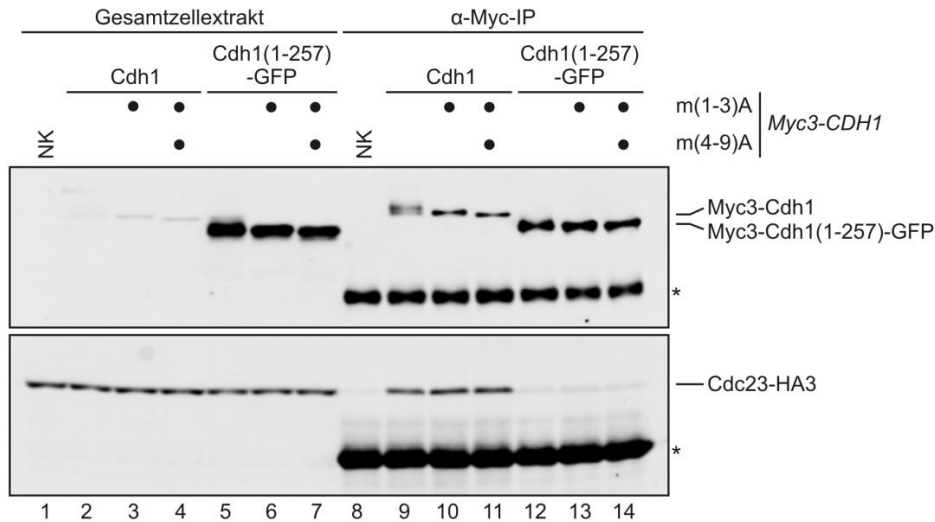


Abbildung 8.5: APC/C-Interaktion von Cdh1-Derivaten in voller Länge und von verkürzten Cdh1(1-257)-GFP-Fusionen

Westernblot-Analyse zur APC/C-Interaktion von Cdh1, Cdh1-m(1-3)A, Cdh1-m11, Cdh1(1-257)-GFP, Cdh1(1-257)-m(1-3)A-GFP und Cdh1(1-257)-m(1-9)A-GFP in asynchron wachsenden Zellen. Die Expression der *CDH1*-Konstrukte erfolgte von dem *GAL1*-Promotor und wurde für 2 h induziert. Die Zellen co-exprimierten eine endogen mit dem HA3-Epitop markierte Version der APC/C-Untereinheit Cdc23. Nach dem Zellaufschluss wurden die Cdh1-Derivate über ein N-terminales Myc3-Epitop mit Hilfe eines Myc-spezifischen Antikörpers aus dem Gesamtzellextrakt immunpräzipitiert. Die Cdh1-Derivate und Cdc23-HA3 wurden in den Gesamtzellextrakten und in den Immunpräzipitaten (α -Myc-IP) mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung von Myc- und HA-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Sternchen markieren das Signal des für die IP verwendeten Myc-spezifischen Antikörpers. Als Negativkontrolle (NK, Spuren 1 und 8) diente ein Stamm, der *CDC23-HA3* aber kein *MYC3-CDH1*-Konstrukt exprimierte.

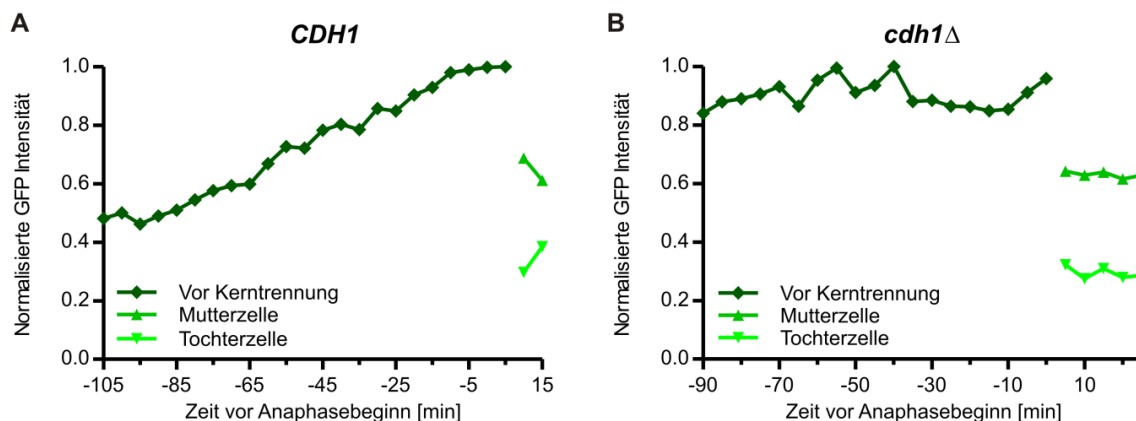


Abbildung 8.6: Stabilität von Cdc20(1-80)-GFP vor der Anaphase in *CDH1*- und *cdh1Δ*-Zellen

(A und B) Messung der GFP-Intensität in *CDH1*- (A) und *cdh1Δ*-Zellen (B), die *CDC20(1-80)-GFP* von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Es wurden über einen Zeitraum von 2 h Zeitrafferaufnahmen mit Abständen von 5 min erstellt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals quantifiziert, auf den Maximalwert des Gesamtsignals, das sich aus der Summe der Signalintensitäten von Mutter- und Tochterzelle ergibt, normiert und gegen die Zeit aufgetragen. Die beginnende Elongation des Zellkerns wurde als Anaphase-Beginn festgelegt und diente als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min). Verändert nach Arnold *et al.*, 2015.

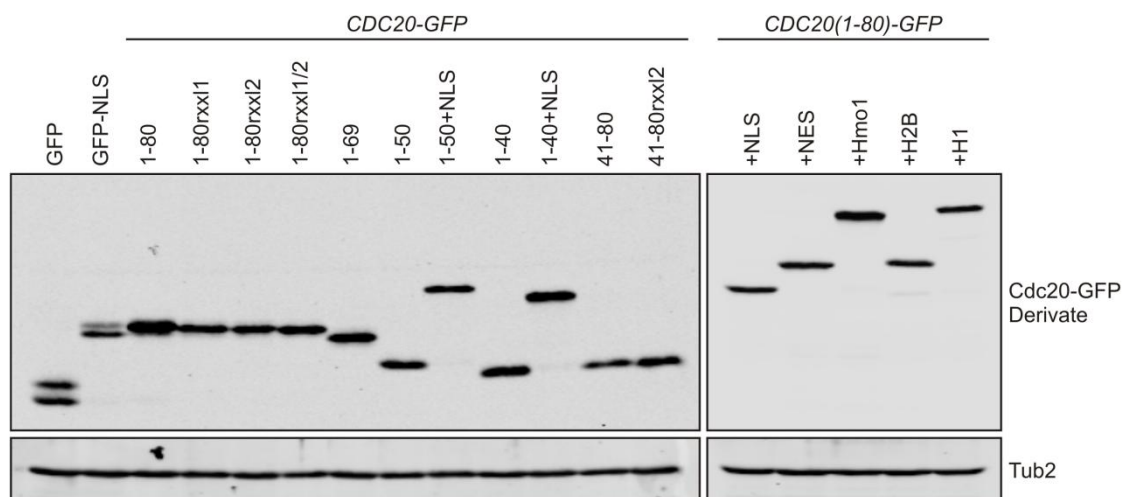


Abbildung 8.7: Vergleich der Expressionslevel der Cdc20-Degron-Konstrukte

Western blot-Analyse zur Expression der angegebenen GFP-Fusionskonstrukte in asynchron wachsenden Zellen. Die Expression der Fusionskonstrukte von dem *GAL1*-Promotor wurde für 2 h induziert und anschließend Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Cdc20-GFP-Fusionsproteine wurden über ein N-terminales Myc3-Epitop und mit Hilfe eines Myc-spezifischen Antikörpers in der Western blot-Analyse detektiert. Tubulin (Tub2) wurde als Ladekontrolle mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen. Verändert nach Arnold *et al.*, 2015.

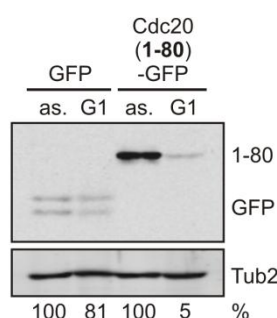


Abbildung 8.8: Vergleich der Expressionslevel von GFP und Cdc20(1-80)-GFP in asynchron wachsenden und G1-arretierten Zellen

Western blot-Analyse zur Expression von GFP und *CDC20(1-80)-GFP* in asynchron wachsenden Zellen (as.) oder in Zellen, die mit α -Faktor in der G1-Phase arretiert wurden (G1). Die Konstrukte wurden für 2 h von dem induzierbaren *GAL1*-Promotor exprimiert und anschließend Gesamtzellextrakte hergestellt. Der Nachweis von GFP und Cdc20(1-80)-GFP erfolgte über ein N-terminales Myc3-Epitop und mit Hilfe eines Myc-spezifischen Antikörpers. Tubulin (Tub2) diente als Ladekontrolle und wurde mit Hilfe eines spezifischen Antiserums detektiert. Auf Grund der höheren, proteolytischen Aktivität in α -Faktor-Zellextrakten richtete sich das aufgetragene Probenvolumen nach dem Tubulin-Signal in einer vorherigen Western blot-Analyse. Die Signalintensitäten von GFP und Cdc20(1-80)-GFP wurden quantifiziert und auf die Signalintensitäten des jeweiligen Tub2-Signals normiert. Die ermittelten Werte sind unterhalb der Westernblots angegeben. Dabei wurde für jedes Konstrukt der Wert für die asynchronen Zellen als 100% festgelegt und der Wert für die G1-arretierten Zellen dazu in Relation gesetzt.

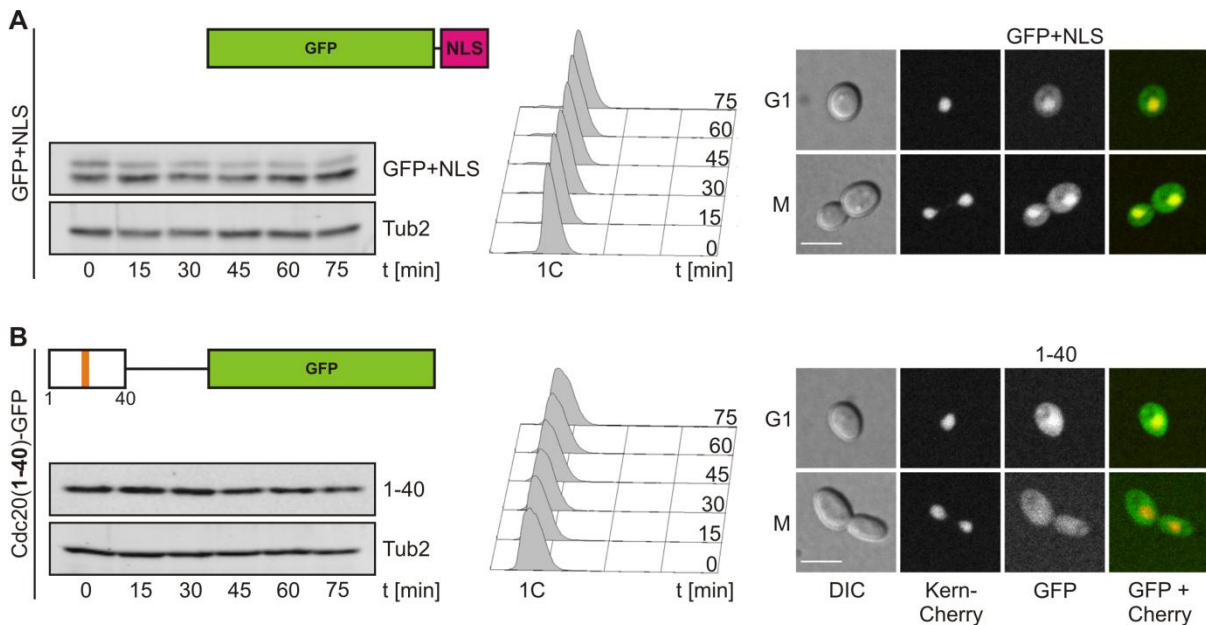


Abbildung 8.9: Stabilität von GFP+NLS und Cdc20(1-40)-GFP in der G1-Phase

(A und B) Stabilität in der G1-Phase und Lokalisation von GFP+NLS (A) und Cdc20(1-40)-GFP (B). Die Stabilitätsmessungen, die Bestimmung des DNA-Gehalts und die Fluoreszenzmikroskopie wurden wie in Abbildung 4.14 B – F beschrieben durchgeführt. Über den Westernblot-Abbildungen sind schematische Darstellungen der Konstrukte gezeigt. Der orange farbene Kasten kennzeichnet das RxxL1-Motiv. Im Vergleich zu Cdc20(1-80) deletierte Regionen sind durch schwarze Linien markiert. Die Zahlen geben Aminosäurepositionen an. Das 1C-Signal in den DNA-Profilen (Mitte) repräsentiert Zellen mit einfachem DNA-Gehalt. Es sind repräsentative Zellen der G1-Phase (obere Bildreihe) und der Mitose (untere Bildreihe) gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. Verändert nach Arnold *et al.*, 2015.

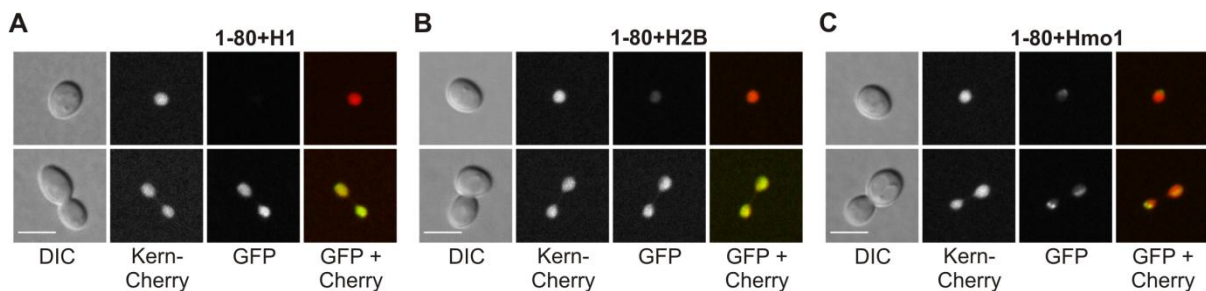


Abbildung 8.10: Co-Lokalisation der Histon- und Hmo1-Fusionen des Cdc20-Degrans mit dem Nukleoplasma

(A – C) Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die *CDC20(1-80)-GFP+H1* (A), *CDC20(1-80)-GFP+H2B* (B) oder *CDC20(1-80)-GFP+Hmo1* (C) von dem regulierbaren *GAL1*-Promotor exprimierten. Die Expression der GFP-Konstrukte wurde vor der Mikroskopie für 1 h in asynchron wachsenden Zellen induziert. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Es sind repräsentative Zellen der G1-Phase (obere Bildreihe) und der Mitose (untere Bildreihe) gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. Verändert nach Arnold *et al.*, 2015.

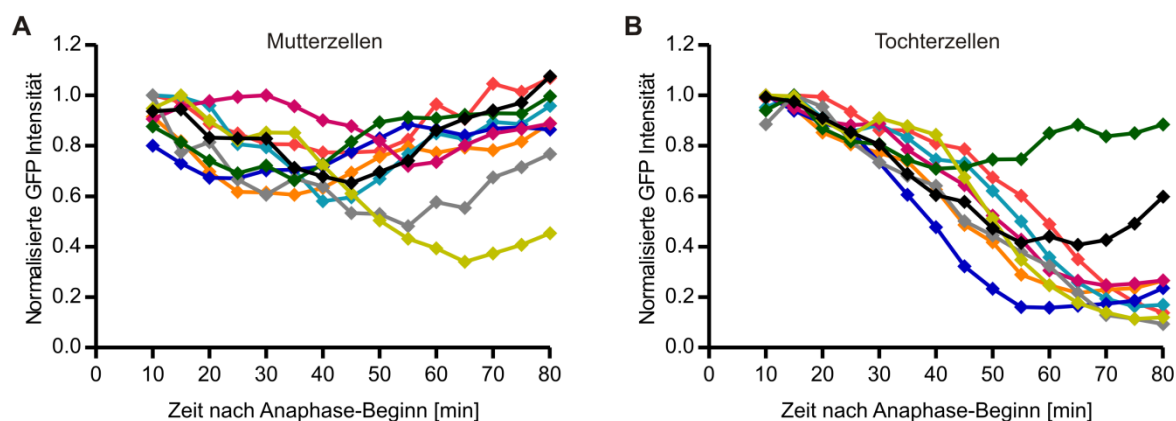


Abbildung 8.11: Vergleich der Degradation von Cdc20(1-80)-GFP in Mutter- und Tochterzellen

(A und B) Messung der GFP-Intensität in Zellen, die *CDC20(1-80)-GFP* von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Es wurden über einen Zeitraum von 2 h Zeitrafferaufnahmen mit Abständen von 5 min erstellt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals nach Beginn der Anaphase für Mutter- (A) und Tochterzellen (B) getrennt quantifiziert, für jede Zelle auf den jeweiligen Maximalwert zu Beginn der Anaphase normiert und gegen die Zeit aufgetragen. Die beginnende Elongation des Zellkerns wurde als Anaphase-Beginn festgelegt und diente als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min). Es wurden jeweils $n = 9$ Zellen ausgewertet und jede Kurve repräsentiert eine Zelle.

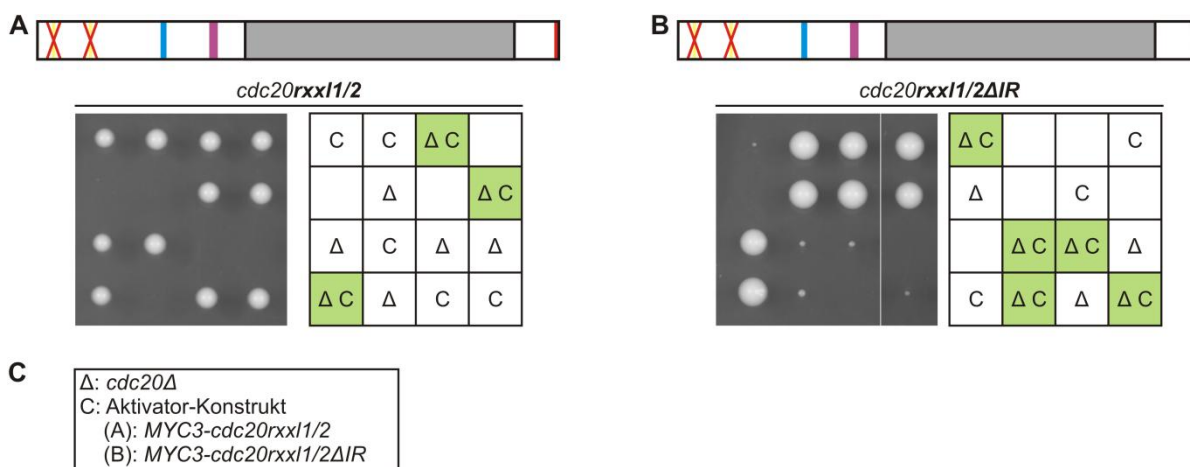


Abbildung 8.12: Komplementation von *cdc20Δ* durch *cdc20rxxl1/2* und *cdc20rxxl1/2ΔIR*

(A und B) Tetradenanalysen zur Komplementation von *cdc20Δ* durch *cdc20rxxl1/2* (A) und *cdc20rxxl1/2ΔIR* (B). Heterozygot-diploide *CDC20/cdc20Δ*-Zellen, welche die angegebenen *CDC20*-Derivate von dem endogenen *CDC20*-Promotor exprimierten, wurden zur Sporulation gebracht und die vier haploiden Nachkommen der entstandenen Tetraden wurden auf einer Vollmediumsplatte vereinzelt. Es sind die Sporen von jeweils vier repräsentativen Tetraden in vertikaler Orientierung gezeigt. Die Tabelle gibt die Auswertung der relevanten Genotypen wieder, wobei grün hinterlegte Felder eine erfolgreiche Komplementation markieren. Zur Veranschaulichung befindet sich über den Tetraden eine schematische Darstellung des jeweiligen Konstrukts. Die RxxL-Motive (orange), die C-Box (blau), das MIM (magenta), die WD40-Domäne (grau) und das IR-Motiv (rot) sind durch farbige Kästen hervorgehoben. Die Mutation der RxxL-Motive (RxxL zu AxxA) ist durch rote Kreuze und die Deletion des IR-Motivs ist durch einen schwarzen Strich gekennzeichnet. In A wurde das Wachstum der Sporen bei 30°C nach 48 h dokumentiert. In B ist das Wachstum der Sporen aus Abbildung 4.23 I nach 72 h bei 30°C gezeigt. (C) Legende zur Auswertung der Genotypen in A und B.

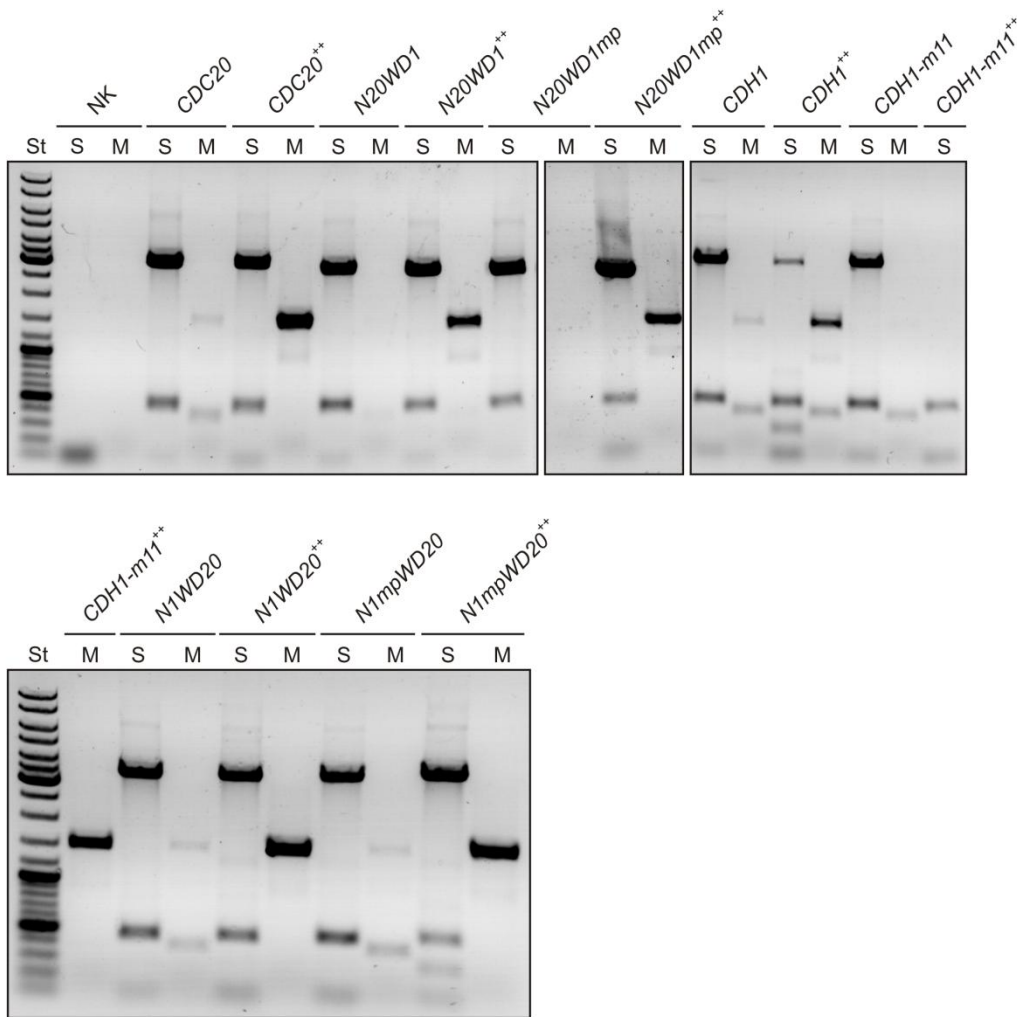
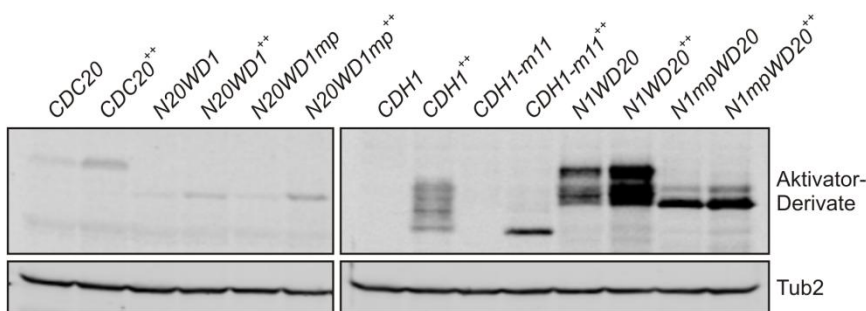
A**B**

Abbildung 8.13: Überprüfung der Integrationszahl der Aktivatorkonstrukte in den Komplementationsstämmen aus Abbildung 4.26 und 8.14

(A und B) Gelelektrophorese nach PCR (A) und Westernblot-Analyse (B) zur Überprüfung der Integrationszahl der Aktivatorkonstrukte in den Komplementationsstämmen. (A) Nach Transformation von heterozygot-diploiden *CDC20/cdc20Δ*-Zellen mit *Ylplac211*-Plasmiden, die die angegebenen Aktivatorkonstrukte enthielten, wurde die genomische DNA aus den resultierenden Stämmen isoliert. Anschließend wurde für jeden Stamm in getrennten PCR-Ansätzen die Integration des Konstrukts (Produkt S) sowie eine mögliche Mehrfach-Integration (Produkt M) überprüft. Als Molekulargewichtsstandard (St) diente der GeneRuler DNA Ladder Mix. Als Negativkontrolle (NK) diente in den PCR-Ansätzen die genomische DNA eines nicht-transformierten Stamms.

(B) Von den ausgewählten Stämmen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und die Aktivatorstrukturen über ein N-terminales HA-Epitop (Aktivatoren mit NTD von Cdc20) oder HA3-Epitop (Aktivatoren mit NTD von Cdh1) und mit Hilfe eines HA-spezifischen Antikörpers in der Westernblot-Analyse nachgewiesen. Tubulin (Tub2) diente als Ladekontrolle und wurde mit Hilfe eines spezifischen Antiserums detektiert. Der Namenszusatz ++ markiert Stämme mit multipler Integration des Aktivatorkonstrukts.

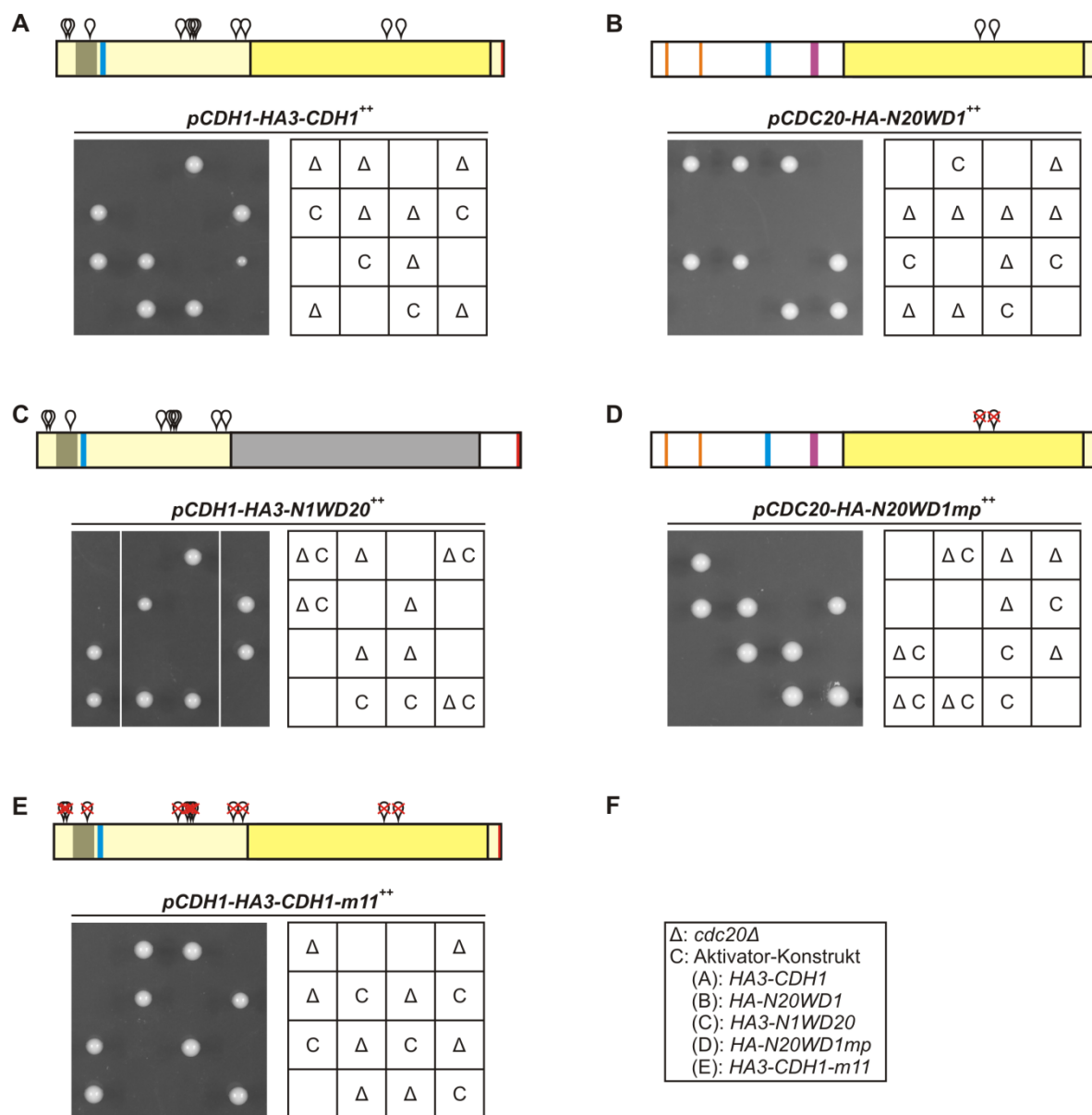


Abbildung 8.14: Komplementation von *cdc20Δ* durch hohe Mengen der Aktivator-Derivate

(A – E) Tetradenanalysen zur Komplementation von *cdc20Δ* durch *CDH1* (A), *N20WD1* (B), *N1WD20* (C), *N20WD1mp* (D) oder *CDH1-m11* (E) bei erhöhter Expression der Aktivator-Derivate. Heterozygot-diploide *CDC20/cdc20Δ*-Zellen, welche die angegebenen Aktivator-Konstrukte von dem *CDH1*-Promotor (A, C und E) oder dem *CDC20*-Promotor (B und D) exprimierten, wurden zur Sporulation gebracht und die vier haploiden Nachkommen der entstandenen Tetraden wurden auf einer Vollmediumsplatte vereinzelt. Das Wachstum der Sporen bei 30°C wurde nach 48 h dokumentiert und anschließend die Genotypen bestimmt. Es sind die Sporen von jeweils vier repräsentativen Tetraden in vertikaler Orientierung gezeigt. Die nebenstehende Tabelle gibt die Auswertung der relevanten Genotypen wieder. Zur Veranschaulichung befinden sich über den Tetraden

schematische Darstellungen der jeweiligen Konstrukte basierend auf der Abbildung 4.25 Die RxxL-Motive (orange), die C-Box (blau), das MIM (magenta), die WD40-Domäne (grau in Cdc20 und kräftiges gelb in Cdh1) und das IR-Motiv (rot) sind durch farbige Kästen hervorgehoben. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen in Cdh1 sind mit weißen Pins markiert. Rote Kreuze kennzeichnen die Mutation der Phosphat-akzeptierenden Aminosäureresten zu Alaninresten (S/TP zu AP). Der Namenszusatz ++ kennzeichnet eine erhöhte Expression der Aktivator-Derivate auf Grund von multiplen Integrationen in das Genom der Stämme (siehe auch Abb. 8.12) **(F)** Legende zur Auswertung der Genotypen in A – E.

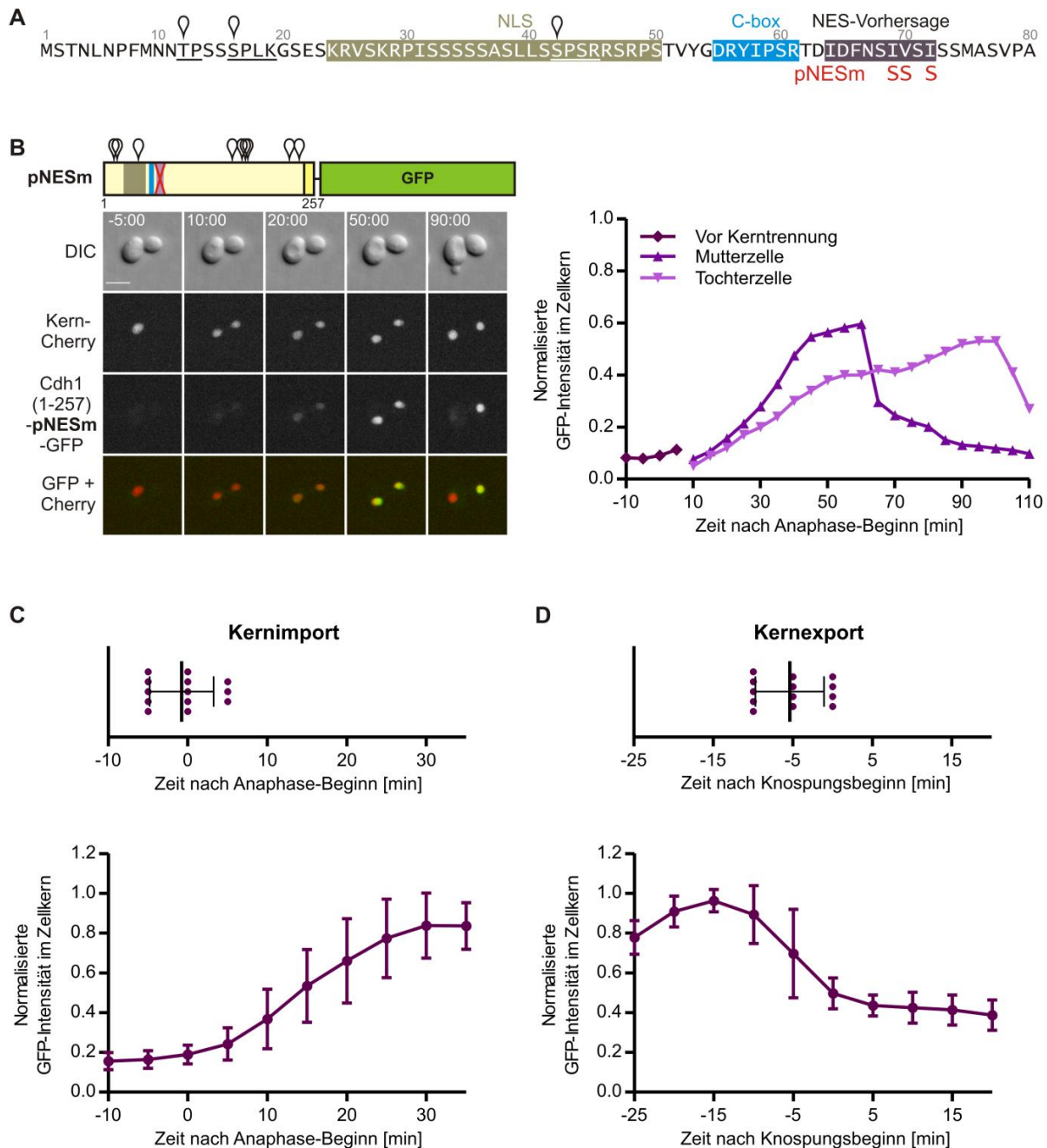


Abbildung 8.15: Rolle einer putativen Exportsequenz für Crm1 für den nukleozytoplasmatischen Transport von Cdh1(1-257)-GFP

(A) Sequenz der N-terminalen 80 Aminosäuren von Cdh1 aus *S. cerevisiae*. Die NLS (oliv), die C-Box (blau) und die durch bioinformatische Analyse vorhergesagte Sequenz für Crm1-abhängigen Kernexport (dunkel-lila; la

Cour *et al.*, 2004) sind farbig hervorgehoben. Die Mutation der putativen NES durch den Austausch hydrophober Aminosäurereste durch Serinreste ist mit dem roten Buchstaben S erklärt. Die Sequenz der Cdk-Phosphorylierungsstellen ist unterstrichen und die Phosphat-akzeptierenden Aminosäuren sind mit weißen Pins markiert. **(B – D)** Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, welche *CDH1(1-257)-pNESm-GFP* von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. (B) Es wurden über einen Zeitraum von 2 h Zeitrafferaufnahmen mit Abständen von 5 min erstellt. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Es sind ausgewählte Zeitwerte für eine repräsentative Zelle gezeigt. Die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals im Zellkern wurde für die gezeigten Zellen wie in Abbildung 4.2 quantifiziert. Die beginnende Elongation des Zellkerns wurde als Anaphase-Beginn festgelegt und diente als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min). Zur Veranschaulichung ist eine schematische Darstellung des Fusionskonstrukts gezeigt. Die NLS (oliv), die C-Box (blau), die putative NES-Sequenz (dunkel-lila) und der Beginn der WD40-Domäne (kräftiges gelb) sind farbig hervorgehoben. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind mit weißen Pins markiert. Das rote Kreuz kennzeichnet die Mutation der putativen NES wie in A angegeben (pNESm). Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. (C und D) Vergleich des Zeitpunkts und der Dynamik des Kernimports (C) und -exports (D) von *Cdh1(1-257)-pNESm-GFP* für $n = 13$ Zellen. Die Quantifizierung des GFP-Signals im Zellkern erfolgte wie in Abbildung 4.3, B und C.

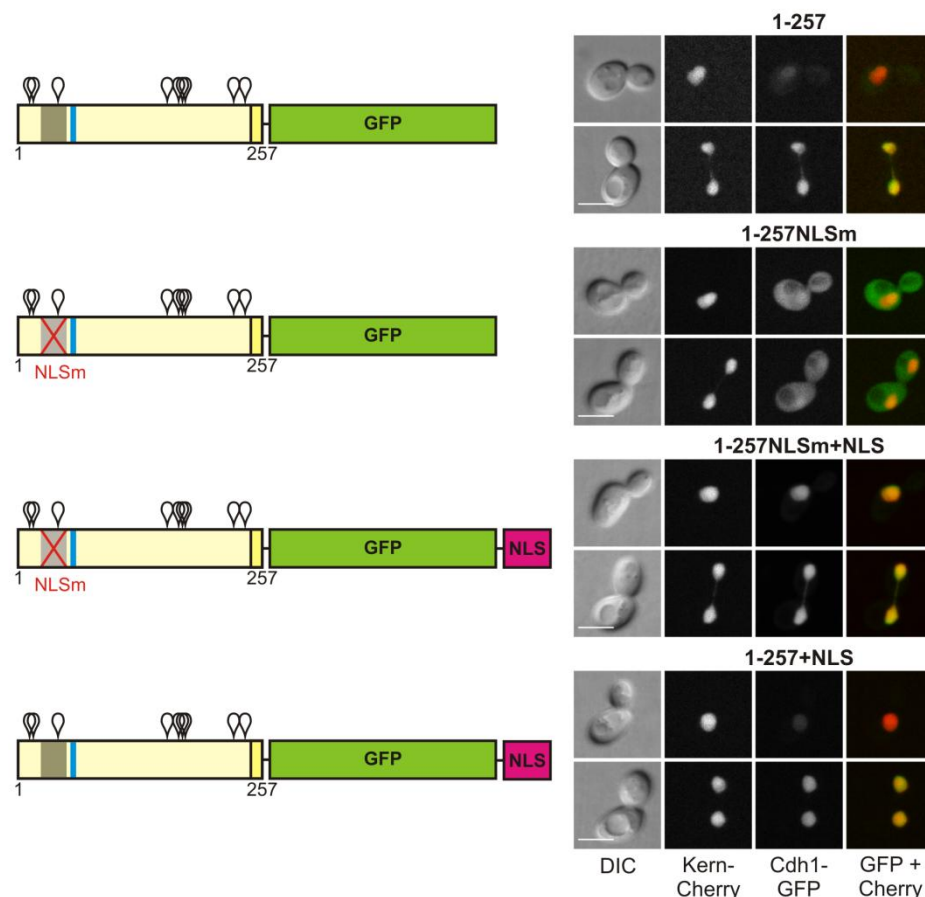


Abbildung 8.16: Einfluss der NLS-Mutation auf den Kernexport von *Cdh1(1-257)-GFP*

Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, welche die angegebenen *CDH1(1-257)-GFP*-Konstrukte von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Für jedes Konstrukt sind repräsentative, mitotische Zellen gezeigt, die sich entweder vor der Anaphase (obere Bildreihe) oder in der späten Anaphase (untere Bildreihe) befinden. Die Stämme co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Zur Veranschaulichung sind schematische Darstellungen der *Cdh1*-Fusionskonstrukte gezeigt. Die vorhergesagte NLS (oliv), die C-Box

(blau) und der Beginn der WD40-Domäne (kräftiges gelb) sind durch farbige Kästen markiert. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind durch weiße Pins gekennzeichnet. Die Mutation der NLS ist durch ein rotes Kreuz symbolisiert. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast.

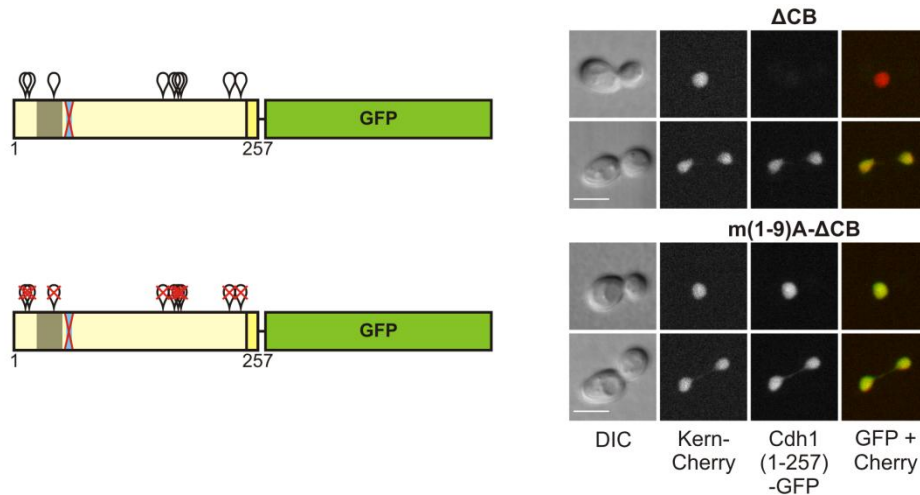


Abbildung 8.17: Rolle der C-Box für den nukleozytoplasmatischen Transport von Cdh1(1-257)-GFP

Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, welche *CDH1(1-257)-ΔCB-GFP* (oben) oder *CDH1(1-257)-m(1-9)A-ΔCB-GFP* (unten) von dem konstitutiven *TEF2*-Promotor exprimierten. Für jedes Konstrukt sind repräsentative, mitotische Zellen gezeigt, die sich entweder vor der Anaphase (obere Bildreihe) oder in der späten Anaphase (untere Bildreihe) befinden. Die Stämme co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Zur Veranschaulichung sind schematische Darstellungen der Cdh1-Fusionskonstrukte gezeigt. Die vorhergesagte NLS (oliv), die C-Box (blau) und der Beginn der WD40-Domäne (kräftiges gelb) sind durch farbige Kästen markiert. Die Positionen der Cdk-Phosphorylierungsstellen sind durch weiße Pins gekennzeichnet und rote Kreuze kennzeichnen die Mutation von Phosphat-akzeptierenden Aminosäureresten zu Alaninresten (S/TP zu AP). Die Deletion der C-Box (ΔCB) ist ebenfalls durch ein rotes Kreuz symbolisiert. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast.

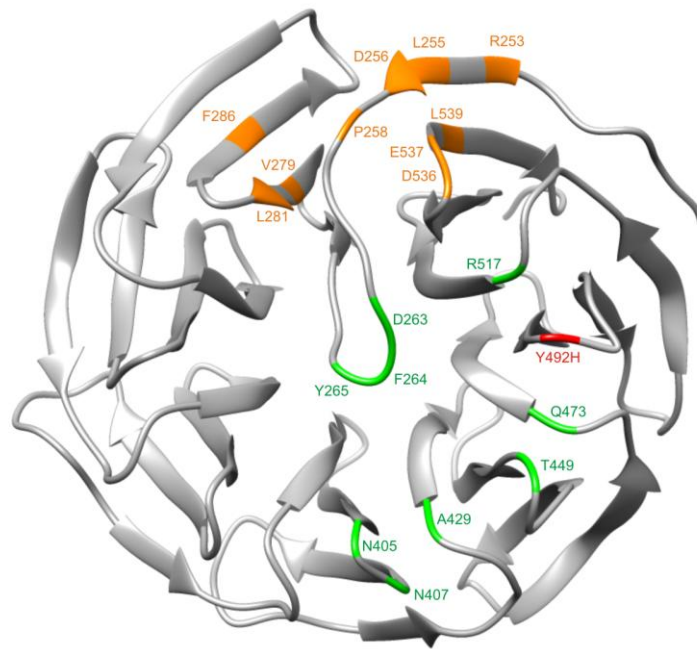


Abbildung 8.18: Lage der Mutation in N20WD1-M1

Modell der WD40-Domäne von Cdh1 aus *S. cerevisiae* basierend auf der publizierten Struktur von He *et al.*, 2013. Die Aminosäuren, die zur Bindung der KEN-Box beitragen, sind grün hervorgehoben und die Aminosäuren der D-Box-Bindestelle sind orange eingefärbt. Die in N20WD1-M1 vorliegende Mutation ist in rot dargestellt.

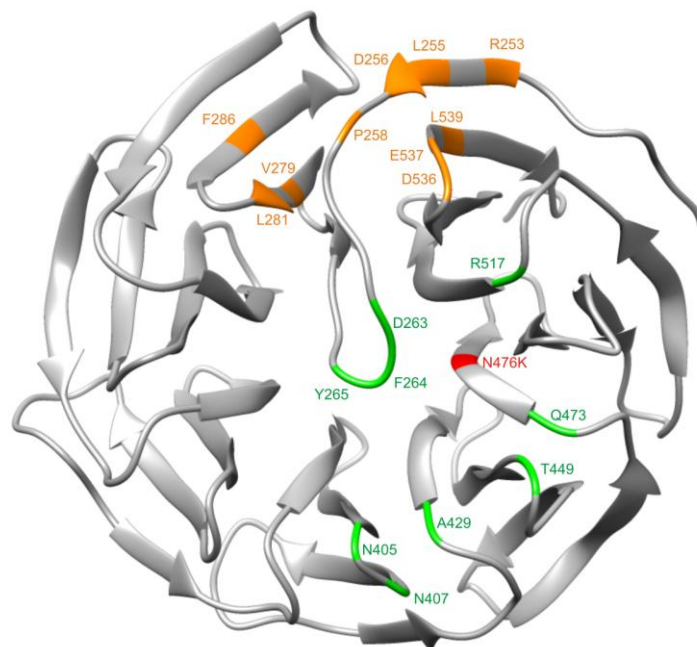


Abbildung 8.19: Lage der Mutation in N20WD1-M3

Modell der WD40-Domäne von Cdh1 aus *S. cerevisiae* basierend auf der publizierten Struktur von He *et al.*, 2013. Die Aminosäuren, die zur Bindung der KEN-Box beitragen, sind grün hervorgehoben und die Aminosäuren der D-Box-Bindestelle sind orange eingefärbt. Die in N20WD1-M3 vorliegende Mutation ist in rot dargestellt.

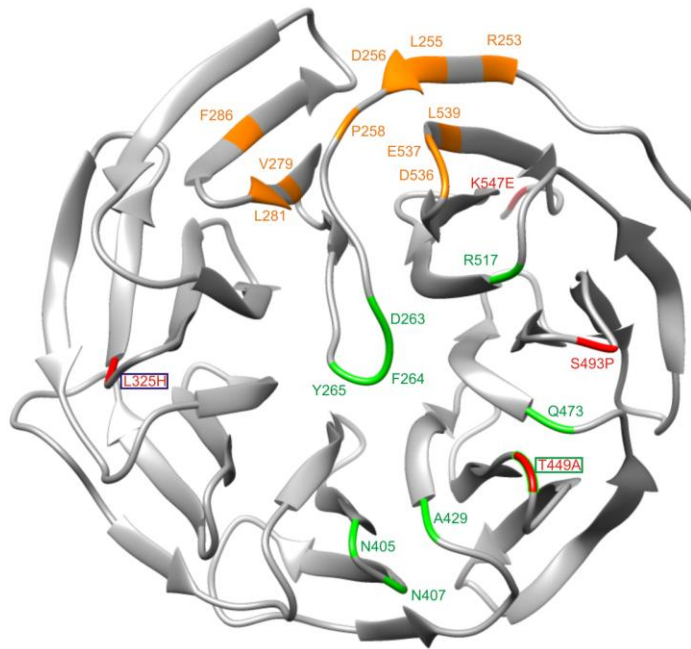


Abbildung 8.20: Lage der Mutationen in N20WD1-M21

Modell der WD40-Domäne von Cdh1 aus *S. cerevisiae* basierend auf der publizierten Struktur von He *et al.*, 2013. Die Aminosäuren, die zur Bindung der KEN-Box beitragen, sind grün hervorgehoben und die Aminosäuren der D-Box-Bindestelle sind orange eingefärbt. Die in N20WD1-M21 vorliegenden Mutationen sind in rot dargestellt. Die farbigen Rahmen markieren Mutationen, die Aminosäuren des KEN-Box-Rezeptors (grün) oder der Bindestelle für das A-Motiv von Acm1 (blau) betreffen.

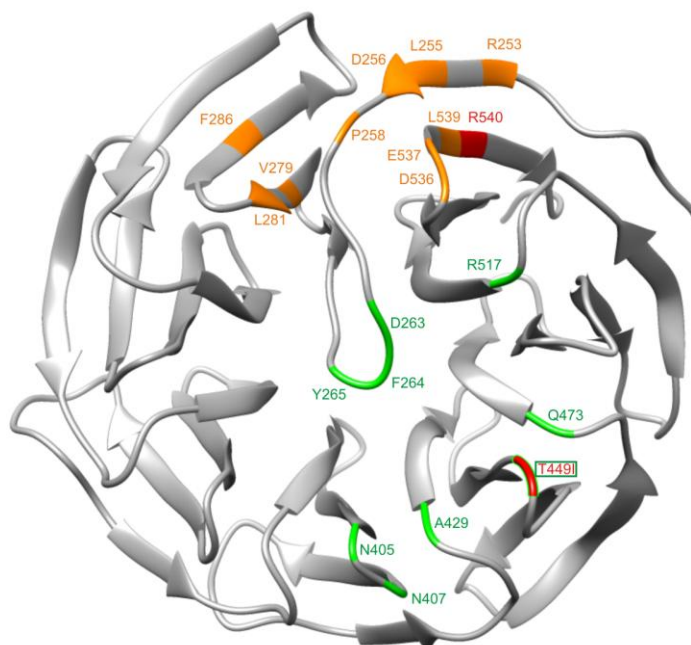


Abbildung 8.21: Lage der Mutationen in N20WD1-M22

Modell der WD40-Domäne von Cdh1 aus *S. cerevisiae* basierend auf der publizierten Struktur von He *et al.*, 2013. Die Aminosäuren, die zur Bindung der KEN-Box beitragen, sind grün hervorgehoben und die Aminosäuren der D-Box-Bindestelle sind orange eingefärbt. Die in N20WD1-M22 vorliegenden Mutationen sind in rot dargestellt, wobei der grüne Rahmen eine Mutation markiert, die den KEN-Box-Rezeptor betrifft.

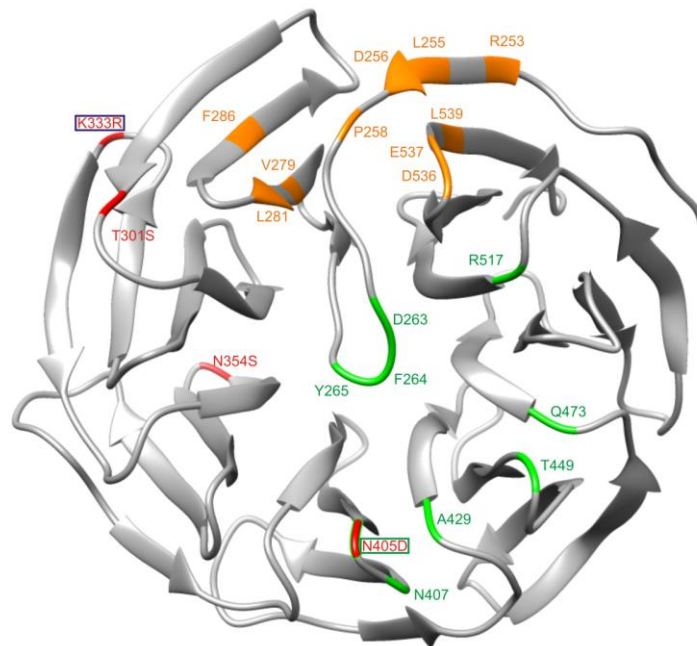


Abbildung 8.22: Lage der Mutationen in N20WD1-M23

Modell der WD40-Domäne von Cdh1 aus *S. cerevisiae* basierend auf der publizierten Struktur von He *et al.*, 2013. Die Aminosäuren, die zur Bindung der KEN-Box beitragen, sind grün hervorgehoben und die Aminosäuren der D-Box-Bindestelle sind orange eingefärbt. Die in N20WD1-M23 vorliegenden Mutationen sind in rot dargestellt. Die farbigen Rahmen markieren Mutationen, die Aminosäuren des KEN-Box-Rezeptors (grün) oder der Bindestelle für das A-Motiv von Acm1 (blau) betreffen.

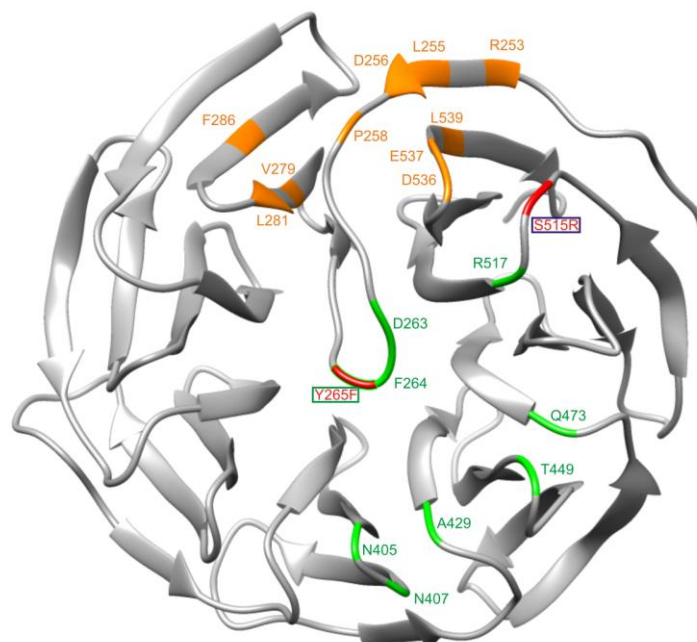


Abbildung 8.23: Lage der Mutationen in N20WD1-M26

Modell der WD40-Domäne von Cdh1 aus *S. cerevisiae* basierend auf der publizierten Struktur von He *et al.*, 2013. Die Aminosäuren, die zur Bindung der KEN-Box beitragen, sind grün hervorgehoben und die Aminosäuren der D-Box-Bindestelle sind orange eingefärbt. Die in N20WD1-M26 vorliegenden Mutationen sind

in rot dargestellt. Die farbigen Rahmen markieren Mutationen, die Aminosäuren des KEN-Box-Rezeptors (grün) oder die Bindung von Acm1 (blau) betreffen.

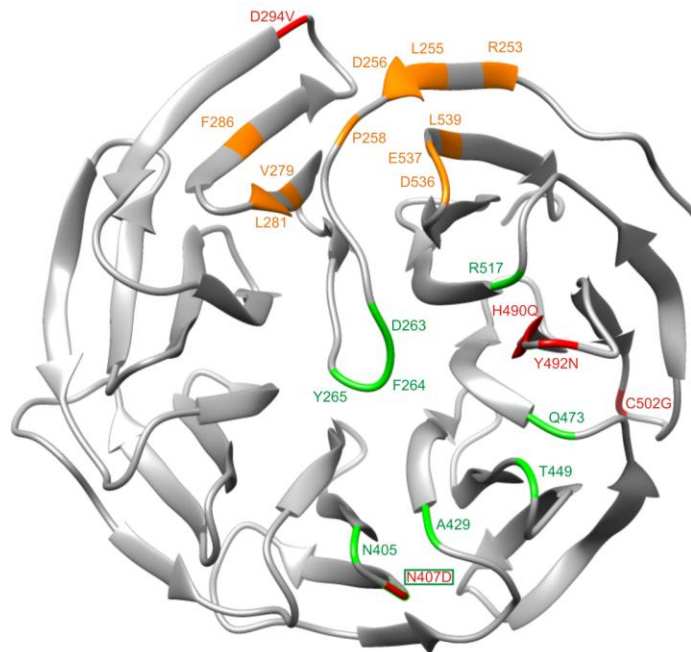


Abbildung 8.24: Lage der Mutationen in N20WD1-M29

Modell der WD40-Domäne von Cdh1 aus *S. cerevisiae* basierend auf der publizierten Struktur von He *et al.*, 2013. Die Aminosäuren, die zur Bindung der KEN-Box beitragen, sind grün hervorgehoben und die Aminosäuren der D-Box-Bindestelle sind orange eingefärbt. Die in N20WD1-M29 vorliegenden Mutationen sind in rot dargestellt. Der grüne Rahmen markiert die Mutation, die eine Aminosäure des KEN-Box-Rezeptors betrifft.

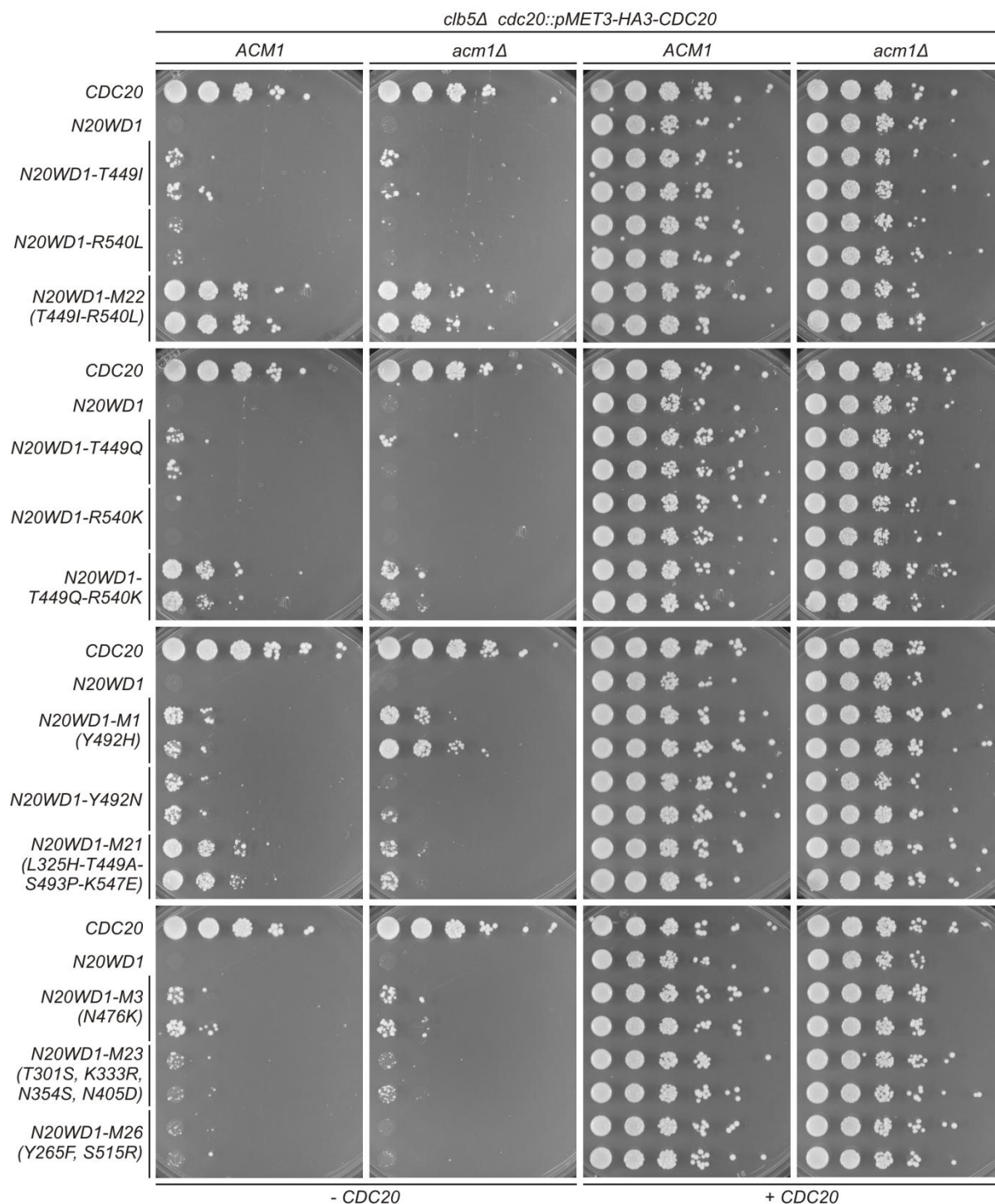


Abbildung 8.25: Einfluss von Acm1 auf die Übernahme der Cdc20-Funktion durch N20WD1

Vergleich des Wachstums von *clb5Δ*- und *clb5Δacm1Δ*-Zellen nach Abschaltung von *CDC20* und Expression verschiedener *N20WD1*-Versionen mit Mutationen in der WD40-Domäne von Cdh1. *clb5Δ*-Zellen, in denen das *ACM1*-Gen entweder intakt (*ACM1*) oder co-deletiert war (*acm1Δ*) und in denen die Expression des endogenen *CDC20* unter Kontrolle des regulierbaren *MET3*-Promotors stand (*cdc20Δ::pMET3-HA3-CDC20*), wurden mit ARS/CEN-Plasmiden transformiert, die entweder *CDC20*, *N20WD1* oder verschiedene mutierte Versionen von *N20WD1* enthielten. Die resultierenden Transformanten wurden zwei Tage in Flüssigmedium ohne Methionin bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurden die Stämme in Form einer Verdünnungsreihe mit 1:10-Schritten ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml auf Selektionsplatten mit Methionin (restriktiv, keine Expression von *CDC20*) oder ohne Methionin (permissiv, *CDC20* exprimiert) getropft und 48 h bei 30°C inkubiert. Das

Flüssigmedium und die Selektionsplatten enthielten kein Uracil, um einen Verlust der ARS/CEN-Plasmide zu verhindern.

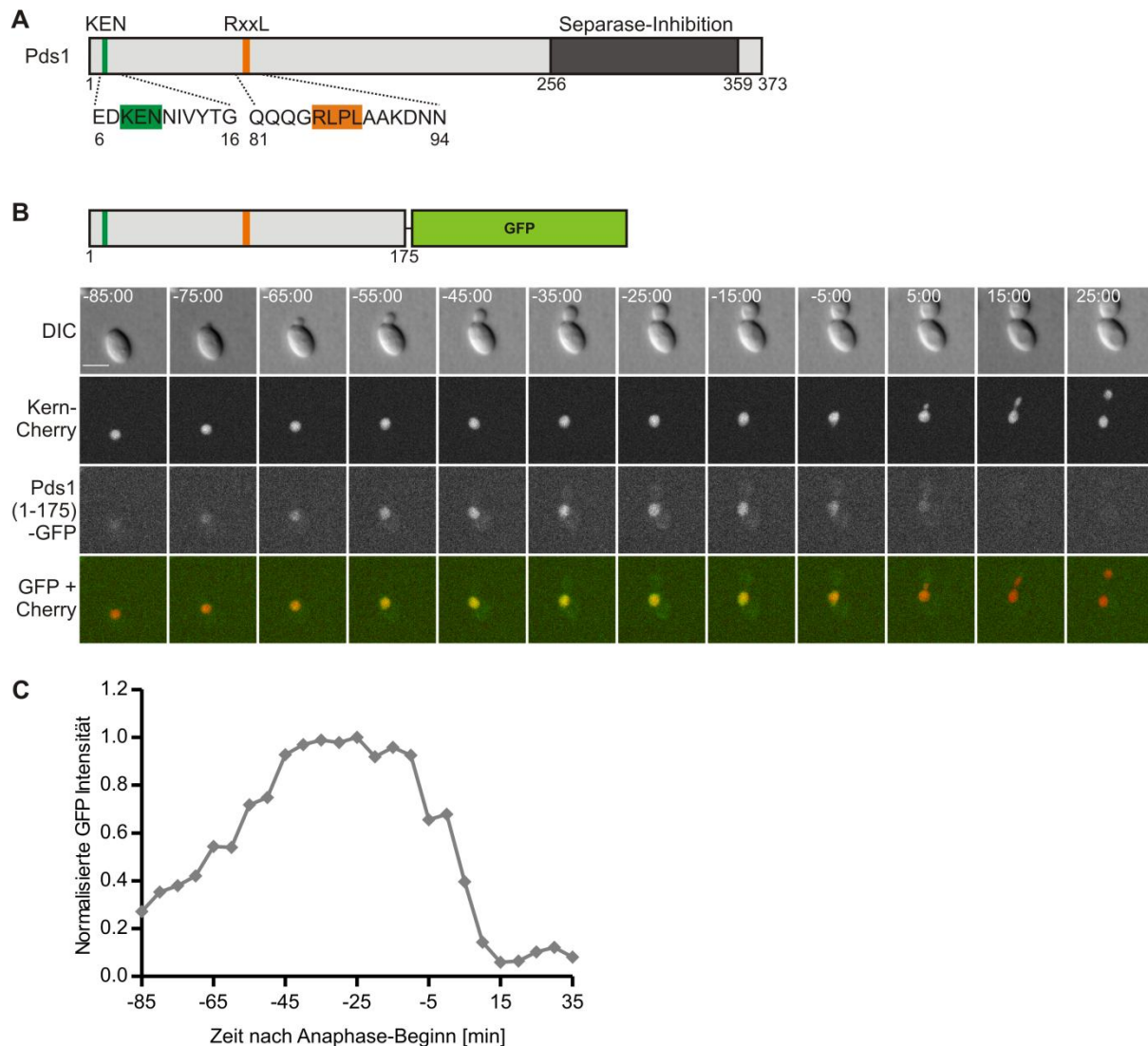


Abbildung 8.26: Fluktuation von Pds1(1-175)-GFP im Zellzyklus

(A) Schematische Darstellung von Pds1 (Securin) aus *S. cerevisiae*. Das KEN-Motiv (dunkelgrün), das RxnL-Motiv (orange) und die Separase-bindende Domäne (dunkelgrau) sind durch farbige Kästen hervorgehoben. Unterhalb des Schemas sind die Sequenzen der Aminosäuren, die das KEN- und das RxnL-Motiv umgeben, angegeben. Die Zahlen beziehen sich auf Aminosäurepositionen. **(B)** Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die *PDS1(1-175)-GFP* von dem *PDS1*-Promotor exprimierten. Es wurden Zeitrafferaufnahmen über einen Zeitraum von 2 h und mit Abständen von 5 min erstellt. Die Zellen co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Die beginnende Elongation des Zellkerns wurde als Anaphase-Beginn festgelegt und diente als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min). Es sind ausgewählte Zeitwerte für eine repräsentative Zelle gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. Über den Zeitrafferaufnahmen befindet sich eine schematische Darstellung des Fusionskonstrukts. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **(C)** Quantifizierung des GFP-Signals der in B gezeigten Zelle. Die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals wurde gemessen, auf den Maximalwert des Gesamtsignals normiert und gegen die Zeit aufgetragen.

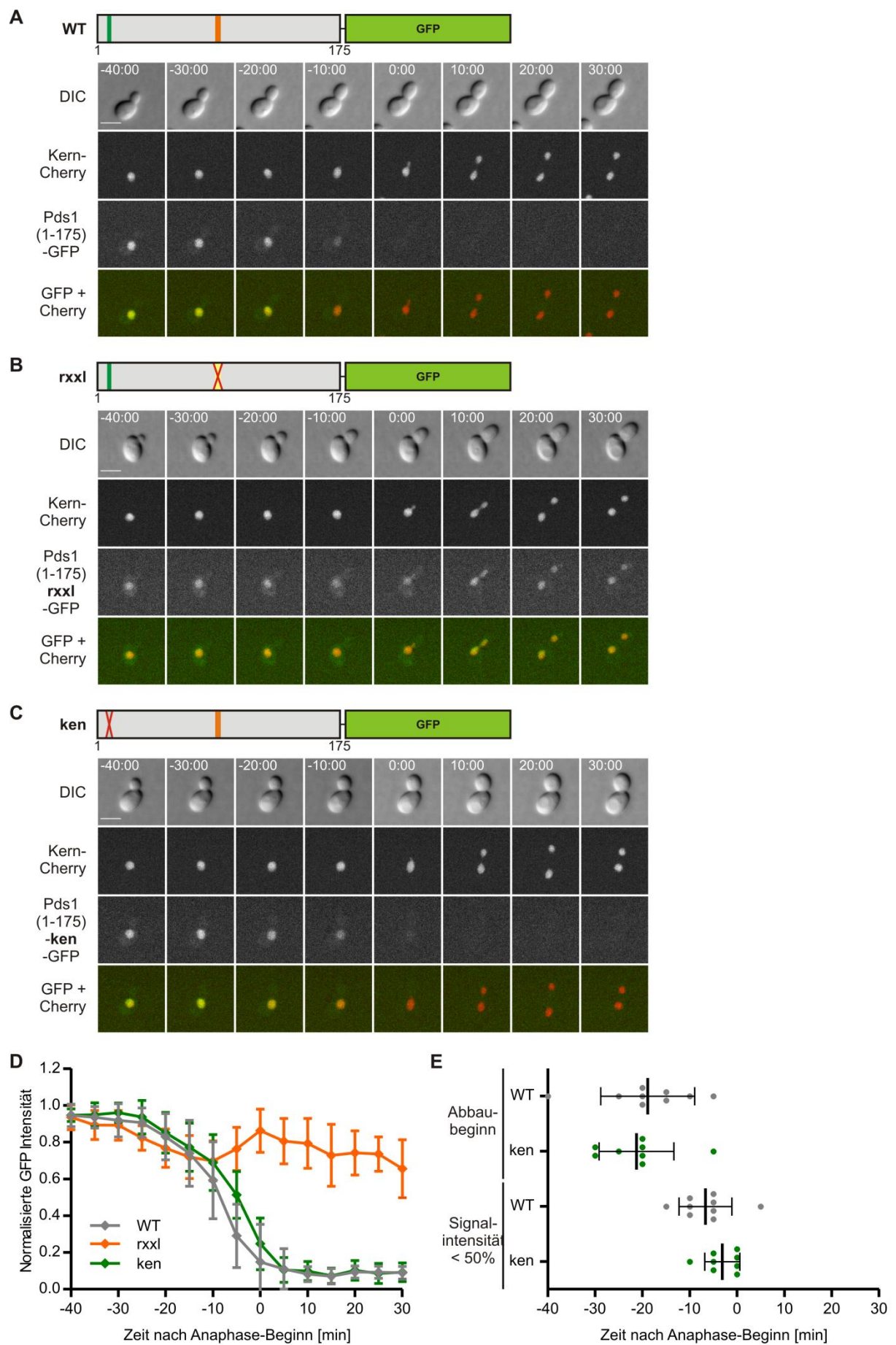


Abbildung 8.27: Rolle des KEN- und des Rxrl-Motivs für die Instabilität von Pds1(1-175)-GFP

(A – C) Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die *PDS1(1-175)-GFP* (A), *pds1(1-175)rxxl-GFP* (B) oder *pds1(1-175)ken-GFP* (C) von dem *PDS1*-Promotor exprimierten. Es wurden über einen Zeitraum von 2h in 5-minütigen Abständen Zeitrafferaufnahmen erstellt. Die Stämme co-exprimierten das Konstrukt Kern-Cherry zur Visualisierung des Zellkerns. Die beginnende Elongation des Zellkerns wurde als Beginn der Anaphase festgelegt und als zeitlicher Bezugspunkt ($t = 0$ min) verwendet. Es sind ausgewählte Zeitwerte für jeweils eine repräsentative Zelle gezeigt. Über den Mikroskopiebildern sind die Konstrukte schematisch dargestellt. Das KEN- (dunkelgrün) und das RxxL-Motiv (orange) sind durch farbige Kästen gekennzeichnet und ihre Inaktivierung durch Alanin-Mutagenese (KEN zu AAA bzw. RxxL zu AxxA) sind durch rote Kreuze symbolisiert. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. DIC: Differential-Interferenz-Kontrast. **(D und E)** Vergleich der Degradation von *Pds1(1-175)-GFP* (WT, grau), *Pds1(1-175)rxxl-GFP* (rxxl, orange) und *Pds1(1-175)ken-GFP*, (ken, dunkelgrün). Wachsende Zellen, welche die angegebenen Konstrukte von dem *PDS1*-Promotor exprimierten, wurden wie in A – C aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals wurde für einzelne Zellen quantifiziert und auf den Maximalwert normiert. Anschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Zellen eines Stamms gegen die Zeit in einem Liniendiagramm aufgetragen (D). Der Zeitwert, ab dem die Signalintensität erstmals um 5% abnahm und im weiteren Verlauf nicht wieder anstieg, wurde als Abbaubeginn definiert und in Form eines Streudiagramms dargestellt (E, oben). Der Zeitwert, an dem die Signalintensität erstmals weniger als die Hälfte des Maximalwerts betrug, wurde ebenfalls bestimmt und in einem Streudiagramm dargestellt (E, unten). In den Streudiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine einzelne Zelle und die Mittel- und Fehlerbalken entsprechen dem Mittelwert und der Standardabweichung. Die Stichprobengrößen betragen $n = 9$ (WT und rxxl) bzw. $n = 8$ (ken) Zellen.

8.2 Ergänzende Tabellen

Tabelle 8.1: Liste der im WD40-Spezifitäts-Screen identifizierten N20WD1-Mutanten

Es sind ausschließlich die N20WD1-Konstrukte aufgelistet, deren Plasmide sich nach der Transformation von W13000 isolieren ließen und nach Re-Transformation von W13000 zur Bildung von Kolonien führten (siehe Kapitel 6.8). Die Spalte „EP-PCR“ gibt die Bedingung der *error-prone* PCR wieder. Die Spalte „Kolonien“ gibt die Anzahl der Kolonien nach der Re-Transformation von W13000 wieder. Die Spalte „Mutationen ohne AS-Austausch“ listet die Mutationen auf, die keinen Austausch einer Aminosäure zur Folge hatten, während die Spalte „Mutationen mit AS-Austausch“ Mutationen auflistet, die zu einer veränderten Aminosäure an entsprechender Position im Protein führten. Vor dem Pfeil ist das ursprüngliche Basen-Triplett des Codons und nach dem Pfeil ist die durch Punktmutation veränderte Sequenz angegeben. In der letzten Spalte ist der resultierende Aminosäureaustausch gekennzeichnet, wobei der Buchstabe nach dem Strichpunkt die äquivalente Aminosäure an dieser Position in Cdc20 wieder gibt. Mutationen, die den für Cdc20 codierenden Bereich betreffen, sind in grauer Schrift dargestellt. Die Codon-Nummern beziehen sich jeweils auf die Position in den *CDC20* und *CDH1*-Genen.

Mutante	EP-PCR [MnCl ₂]	Kolonien	Mutationen ohne AS-Austausch	Mutationen mit AS-Austausch
M1	0,25 mM	82	Codon 246: AAT → AAC	Codon 492: TAC → CAC (Y492H; N)
M3	0,25 mM	7	Codon 431: AAG → AAA	Codon 476: AAT → AAA (N476K; S)
M4	0,25 mM	2	nicht sequenziert	
M5	0,25 mM	3	nicht sequenziert	
M9	0,25 mM	2	nicht sequenziert	
M16	0,25 mM	3	nicht sequenziert	
M21	0,25 mM	108		Codon 325: CTT → CAT (L325H; N) Codon 449: ACA → GCA (T449A; Q) Codon 493: TCA → CCA (S493P; P) Codon 547: AAA → GAA (K547E; P)
M22	0,25 mM	151		Codon 449: ACA → ATA (T449I; Q) Codon 540: CGA → CTA (R540L; K)
M23	0,25 mM	18		Codon 301: ACG → TCG (T301S; F) Codon 333: AAA → AGA (K333R; T) Codon 354: AAT → AGT (N354S; D) Codon 405: AAC → GAC (N405D; N)
M24	0,25 mM	3	nicht sequenziert	
M26	0,25 mM	7	Codon 304: GAA → GAG Codon 450: GCA → GCG Codon 468: ATA → ATT Codon 561: GCA → GCC	Codon 265: TAC → TTC (Y265F; Y) Codon 515: AGT → AGG (S515R; E)
M27	0,5 mM	3	nicht sequenziert	
M28	0,5 mM	1	nicht sequenziert	
M29	0,5 mM	1520	Codon 351: TCT → TCA Codon 380: ACT → ACC	Codon 242: TTA → ATA (L242I; L) Codon 294: GAC → GTC (D294V; D) Codon 407: AAC → GAC (N407D; N) Codon 490: CAT → CAG (H490Q; G) Codon 492: TAC → AAC (Y492N; N) Codon 502: TGT → GGT (C502G; Y)

Tabelle 8.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme

Die Quellenangabe Sammlung bezieht sich auf die Stammsammlung der Arbeitsgruppe Seufert. *Kern-Cherry-TRP1*¹: pTEF2-mCherry-SWI5(codons569-709)S646A/S664A-MYC13-tCYC1 beschrieben in Arnold *et al.*, 2015. *NLS*²: Codons 614-663 des *SWI5*-Gens mit der Punktmutation S646A (Moll *et al.*, 1991). *NES*³: Codons 441-518 des *NMD3*-Gens (Gadal *et al.*, 2001).

Name	Relevanter Genotyp	Quelle	Abbildung
W14260	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.1, 8.2
W14155	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pMET25-yEGFP-CDH1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.1, 4.8, 8.2
W14271	<i>MATα CDC11-3mCherry-LEU2</i> <i>ura3::pMET25-yEGFP-CDH1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.1
W13704	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-257)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.1, 4.2, 4.8, 8.2, 8.16
W13317	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-yEGFP-CDH1(245-566)-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.1, 8.2
W14417	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-257)-yEGFP-tCYC1-URA3</i> ²	diese Arbeit	4.3, 8.2
W14422	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(145-257)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.3, 8.2
W13404	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-144)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.3, 8.2
W13840	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-100)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.3, 8.2
W13838	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-63)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.3, 8.2
W14479	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-257)-NLSm-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.4, 8.2, 8.16
W14418	<i>MATα ura3::pTEF2-CDH1(12-257)-yEGFP-tCYC1-URA3</i> <i>Kern-Cherry-TRP1</i> ¹	diese Arbeit	4.4, 8.2
W14478	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(21-257)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.4, 8.2
W13917	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(32-257)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.4, 8.2
W13346	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-9)A-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.5, 8.2
W13837	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-257)-m(4-9)A-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.5, 4.7, 4.8, 8.2
W13698	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-3)A-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.5, 4.8, 8.2
W14050	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-2)A-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.5, 4.7, 8.2
W14041	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-257)-m(4-9)D-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.6, 4.7, 8.2
W14042	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-3)A-m(4-9)D-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.6, 8.2
W14109	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>ura3::pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-3)D-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.6, 8.2
W14421	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1</i> ¹ <i>CDC23-yEGFP-SpHIS5</i>	diese Arbeit	4.8, 8.3

W14278	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pMET25-yEGFP-CDH1-m(1-3)A-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.8, 8.2
W14279	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pMET25-yEGFP-CDH1-m(4-9)A-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.8, 8.2
W1641	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2</i>	Sammlung	4.8, 4.10, 8.4
W14125	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 met15::pGALL-HA3-CDH1-tCYC1</i>	diese Arbeit	4.8, 4.10,
W14127	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(1-3)A-tCYC1</i>	diese Arbeit	4.8, 4.10
W14129	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(4-9)A-tCYC1</i>	diese Arbeit	4.8, 4.10
W14134	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(1-7)A-tCYC1</i>	diese Arbeit	4.8
W14180	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(1-3,8-9)A-tCYC1</i>	diese Arbeit	4.8
W14128	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(1-9)A-tCYC1</i>	diese Arbeit	4.8, 4.10
W14616	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 ura3::pGAL1-10-CLB2-Δdb- URA3 ADE2</i>	diese Arbeit	4.9
W14617	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 ura3::pGAL1-10-CLB2-Δdb- URA3 met15::pGALL-HA3-CDH1-tCYC1 ADE2</i>	diese Arbeit	4.9
W14618	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 ura3::pGAL1-10-CLB2-Δdb- URA3 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(1-3)A-tCYC1 ADE2</i>	diese Arbeit	4.9
W14620	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 ura3::pGAL1-10-CLB2-Δdb- URA3 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(4-9)A-tCYC1 ADE2</i>	diese Arbeit	4.9
W14621	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 ura3::pGAL1-10-CLB2-Δdb- URA3 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(1-7)A-tCYC1 ADE2</i>	diese Arbeit	4.9
W14622	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 ura3::pGAL1-10-CLB2-Δdb- URA3 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(1-3,8-9)A-tCYC1 ADE2</i>	diese Arbeit	4.9
W14619	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 ura3::pGAL1-10-CLB2-Δdb- URA3 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(1-9)A-tCYC1 ADE2</i>	diese Arbeit	4.9
W14130	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(4-9)D-tCYC1</i>	diese Arbeit	4.10
W14131	<i>MATα CDC23-MYC9-LEU2 met15::pGALL-HA3-CDH1-m(1-3)A-m(4-9)D-tCYC1</i>	diese Arbeit	4.10
W11921	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pTEF2-yEGFP-MYC3-CDC20-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.11
W13315	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pTEF2-yEGFP-CDC20(243-610)-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.11
W11727	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ leu2::pTEF2-CDC20(1-248)-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit	4.11
W13314	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pTEF2-CDC20(1-180)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.11
W11726	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ leu2::pTEF2-CDC20(1-119)-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit	4.11
W11725	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ leu2::pTEF2-CDC20(1-80)-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit	4.11, 4.12, 4.13, 4.17, 8.6, 8.11
W11728	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ hct1-4::HIS3 leu2::pTEF2-CDC20(1-80)-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit	4.13, 8.6

W9248	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.14, 8.7, 8.8
W11999	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.14
W11866	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.14, 8.7, 8.8
W11729	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.14, 4.18
W11734	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc20(1-80)rxxl1/2-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.14, 8.7
W11737	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-cdc20(1-80)rxxl1/2-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.14
W11733	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc20(1-80)rxxl2-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.14, 8.7
W11736	<i>MATa Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-cdc20(1-80)rxxl2-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.14
W11732	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc20(1-80)rxxl1-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.14, 8.7
W11735	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-cdc20(1-80)rxxl1-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.14
W12881	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-69)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15, 8.7
W12969	<i>MATa Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-69)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15
W12880	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-50)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15, 8.7
W12968	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-50)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15
W13084	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(41-80)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15, 8.7
W12878	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(41-80)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15
W13085	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc20(41-80)rxxl2-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15, 8.7
W12879	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(41-80)rxxl2-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15
W12967	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-50)-yEGFP-NLS²-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15, 8.7
W12970	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-50)-yEGFP-NLS²-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15
W12746	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-40)-yEGFP-NLS²-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15, 8.7
W12751	<i>MATa Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-40)-yEGFP-NLS²-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.15
W11845	<i>MATa Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-NES³-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.16
W11828	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-NES³-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.16, 8.7
W12753	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-NLS²-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.16
W12748	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-NLS²-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.16, 8.7

W12446	<i>MATα HTA2-yEmRFP-SpHIS5</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HHO1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.16
W12435	<i>MATα bar1Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HHO1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.16, 8.7
W12445	<i>MATα HTA2-yEmRFP-SpHIS5</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HTB1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.16
W12434	<i>MATα bar1Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HTB1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.16, 8.7
W12149	<i>MATα bar1Δ::kanMX4 NOP56-3mCherry-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HMO1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.16
W12140	<i>MATα bar1Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HMO1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.16, 8.7
W12754	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹</i> <i>leu2::pTEF2-cdc20(1-80)-S24A-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit	4.17
W12755	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹</i> <i>leu2::pTEF2-cdc20(1-80)-S24D-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit	4.17
K699	<i>MATα ade2-1 can1-100 his3-11,-15 leu2-3,-112 trp1-1</i> <i>ura3-2 ssd1</i>	Sammlung	4.18, 4.20, 4.23, 8.4
W13313	<i>MATα</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-248)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.18, 4.20
W13403	<i>MATα</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-180)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.18
W11730	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-119)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.18
W13667	<i>MATα PDS1-HA6-HIS3 CLB5-FLAG3-kanMX6</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-248)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.19
W13666	<i>MATα PDS1-HA6-HIS3 CLB5-FLAG3-kanMX6</i>	diese Arbeit	4.19
W13668	<i>MATα cdh1Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-248)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.20
W13348	<i>MATα cdh1Δ::kanMX4</i>	Sammlung	4.20
W8458	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹</i>	Sammlung	4.21, 8.2
W12400	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹</i> <i>leu2::pTEF2-CDC20(1-248)-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	Sammlung	4.21
W12401	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹</i> <i>leu2::pTEF2-cdc20(1-248)rxl1-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	Sammlung	4.21
W12404	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹</i> <i>leu2::pTEF2-cdc20(1-248)ΔCB-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	Sammlung	4.21
W10907	<i>MATα/α CDC20/cdc20Δ::HIS3</i> <i>ura3/ura3::pCDC20-MYC3-CDC20-URA3</i>	Sammlung	4.22
W12415	<i>MATα/α CDC20/cdc20Δ::HIS3</i> <i>ura3/ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxl1-URA3</i>	diese Arbeit	4.22
W12416	<i>MATα/α CDC20/cdc20Δ::HIS3</i> <i>ura3/ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxl2-URA3</i>	diese Arbeit	4.22
W12417	<i>MATα/α CDC20/cdc20Δ::HIS3</i> <i>ura3/ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxl1/2-URA3</i>	diese Arbeit	4.22, 8.12
W10909	<i>MATα/α CDC20/cdc20Δ::HIS3</i> <i>ura3/ura3::pCDC20-MYC3-cdc20ΔIR-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.22
W12418	<i>MATα/α CDC20/cdc20Δ::HIS3</i> <i>ura3/ura3::pCDC20-MYC3- cdc20rxl1ΔIR-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.22
W12419	<i>MATα/α CDC20/cdc20Δ::HIS3</i> <i>ura3/ura3::pCDC20-MYC3- cdc20rxl1ΔIR⁺⁺-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.22

W12420	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDC20-MYC3- cdc20rxxl2ΔIR-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.22
W12421	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDC20-MYC3- cdc20rxxl2ΔIR⁺⁺-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.22
W12422	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDC20-MYC3- cdc20rxxl1/2ΔIR-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.22, 8.12
W12423	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDC20-MYC3- cdc20rxxl1/2ΔIR⁺⁺-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.22
W11094	<i>MATa cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-CDC20-URA3</i>	Sammlung	4.23
W12424	<i>MATα cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxxl1-URA3</i>	diese Arbeit	4.23
W12425	<i>MATα cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxxl2-URA3</i>	diese Arbeit	4.23
W12426	<i>MATa cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxxl1/2-URA3</i>	diese Arbeit	4.23
W11096	<i>MATa cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-cdc20ΔIR-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	4.23
W12427	<i>MATa cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxxl1ΔIR-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.23
W12428	<i>MATα cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxxl1ΔIR⁺⁺-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.23
W12429	<i>MATα cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxxl2ΔIR-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.23
W12430	<i>MATα cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxxl2ΔIR⁺⁺-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.23
W12431	<i>MATa cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxxl1/2ΔIR-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.23
W12432	<i>MATα cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-MYC3-cdc20rxxl1/2ΔIR⁺⁺-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.23
W12144	<i>MATα PDS1-HA6-HIS3 CLB5-FLAG3-kanMX6 ura3::pGAL1-MYC9-CDC20-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.24
W12437	<i>MATα PDS1-HA6-HIS3 CLB5-FLAG3-kanMX6 ura3::pGAL1-MYC9-cdc20rxxl1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.24
W12438	<i>MATα PDS1-HA6-HIS3 CLB5-FLAG3-kanMX6 ura3::pGAL1-MYC9-cdc20rxxl2-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.24
W12439	<i>MATα PDS1-HA6-HIS3 CLB5-FLAG3-kanMX6 ura3::pGAL1-MYC9-cdc20rxxl1/2-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.24
W12741	<i>MATa PDS1-HA6-HIS3 CLB5-FLAG3-kanMX6 ura3::pGAL1-MYC9-cdc20ΔIR-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	4.24
W13509	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDC20-HA-CDC20-URA3</i>	diese Arbeit	4.26, 8.13
W13514	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDH1-HA3-CDH1-URA3</i>	diese Arbeit	4.26, 8.13
W13518	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDH1-HA3-N1WD20-URA3</i>	diese Arbeit	4.26, 8.13
W13511	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDC20-HA-N20WD1-URA3</i>	diese Arbeit	4.26, 8.13
W13520	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDH1-HA3-N1mpWD20-URA3</i>	diese Arbeit	4.26, 8.13
W13512	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDC20-HA-N20WD1mp-URA3</i>	diese Arbeit	4.26, 8.13

W13516	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDH1-HA3-CDH1-m11-URA3</i>	diese Arbeit	4.26, 8.13
W14051	<i>MATa cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDC20-HA-CDC20-URA3 bar1Δ::LEU2 PDS1-MYC13-SpHIS5 CLB5-FLAG3-kanMX6 trp1::pSIC1-SIC1-HA3-tADH1-TRP1</i>	diese Arbeit	4.27, 4.28
W14052	<i>MATa cdc20Δ::HIS3 ura3::pCDH1-HA3-N1mpWD20-URA3 bar1Δ::LEU2 PDS1-MYC13-SpHIS5 CLB5-FLAG3-kanMX6 trp1::pSIC1-SIC1-HA3-tADH1-TRP1</i>	diese Arbeit	4.27, 4.28
W13000	<i>MATα clb5Δ::HIS3MX6 cdc20::pMET3-HA3-CDC20-TRP1</i>	diese Arbeit	4.29, 4.30, 8.25
W10034	<i>MATa cdc20::pMET3-HA3-CDC20-TRP1</i>	Sammlung	4.31
W14613	<i>MATa met15::pGALL-HA3-CDH1-tCYC1</i>	diese Arbeit	8.4
W14614	<i>MATa/α CDC23/CDC23-MYC9-LEU2 ade2/ADE2</i>	diese Arbeit	8.4
W14615	<i>MATa/α CDC23/CDC23-MYC9-LEU2 ade2/ADE2 MET15/met15::pGALL-HA3-CDH1-tCYC1</i>	diese Arbeit	8.4
W1639	<i>MATa CDC23-HA3-LEU2</i>	Sammlung	8.5
W1913	<i>MATa CDC23-HA3-LEU2 trp1::pGAL1-MYC3-CDH1-tCYC1-TRP1</i>	Sammlung	8.5
W1914	<i>MATa CDC23-HA3-LEU2 trp1::pGAL1-MYC3-CDH1-m(1-3)A-tCYC1-TRP1</i>	Sammlung	8.5
W1916	<i>MATa CDC23-HA3-LEU2 trp1::pGAL1-MYC3-CDH1-m11-tCYC1-TRP1</i>	Sammlung	8.5
W13803	<i>MATa CDC23-HA3-LEU2 ura3::pGAL1-MYC3-CDH1(1-257)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.5
W13804	<i>MATa CDC23-HA3-LEU2 ura3::pGAL1-MYC3-CDH1(1-257)-m(1-3)A-yEGFP-tCYC1- URA3</i>	diese Arbeit	8.5
W13805	<i>MATa CDC23-HA3-LEU2 ura3::pGAL1-MYC3-CDH1(1-257)-m(1-9)A-yEGFP-tCYC1- URA3</i>	diese Arbeit	8.5
W12234	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-yEGFP-NLS²-tCYC1-URA3</i>	Sammlung	8.7, 8.9
W12750	<i>MATa Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-yEGFP-NLS²-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.9
W12744	<i>MATa bar1Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-40)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.7, 8.9
W12752	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-40)-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.9
W12742	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HHO1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.10
W12743	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HTB1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.10
W12433	<i>MATa Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HMO1-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.10
W13510	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDC20-HA-CDC20⁺⁺-URA3</i>	diese Arbeit	8.13
W13629	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDC20-HA-N20WD1⁺⁺-URA3</i>	diese Arbeit	8.13, 8.14
W13513	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDC20-HA-N20WD1mp⁺⁺-URA3</i>	diese Arbeit	8.13, 8.14

W13515	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDH1-HA3-CDH1⁺⁺-URA3</i>	diese Arbeit	8.13, 8.14
W13517	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDH1-HA3-CDH1-m11⁺⁺-URA3</i>	diese Arbeit	8.13, 8.14
W13519	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDH1-HA3-N1WD20⁺⁺-URA3</i>	diese Arbeit	8.13, 8.14
W13521	<i>MATa/α CDC20/cdc20Δ::HIS3 ura3/ura3::pCDH1-HA3-N1mpWD20⁺⁺-URA3</i>	diese Arbeit	8.13
W14411	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::TEF2-CDH1(1-257)-pNESm-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.15
W14480	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::TEF2-CDH1(1-257)-NLSm-yEGFP-NLS²-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.16
W14413	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::TEF2-CDH1(1-257)-yEGFP-NLS²-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.16
W14415	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::TEF2-CDH1(1-257)-ΔCB-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.17
W14416	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ ura3::TEF2-CDH1(1-257)-m(1-9)A-ΔCB-yEGFP-tCYC1-URA3</i>	diese Arbeit	8.17
W13925	<i>MATα clb5Δ::HIS3MX6 acm1Δ::kanMX6 cdc20::pMET3-HA3-CDC20-TRP1</i>	diese Arbeit	8.25
W13631	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ leu2::pPDS1-PDS1(1-175)-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit	8.26, 8.27
W13809	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ leu2::pPDS1-PDS1(1-175)rxl1-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit	8.27
W13808	<i>MATα Kern-Cherry-TRP1¹ leu2::pPDS1-PDS1(1-175)ken-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	diese Arbeit	8.27

Tabelle 8.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Die Quellenangabe Sammlung bezieht sich auf die Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe Seufert. *CDH1(bp211-854)-m(4-9)D¹*: Das Plasmid stammt aus kommerzieller Gensynthese (eurofins Gemonics GmbH, Ebersberg). *CDH1(bp211-854)-m(4-9)D²*: Dieses Plasmid entspricht pWS4455 nach Re-Transformation. *NLS³*: Codons 614-663 des *SWI5*-Gens mit der Punktmutation S646A (Moll *et al.*, 1991). *NES⁴*: Codons 441-518 des *NMD3*-Gens (Gadal *et al.*, 2001).

Name	Beschreibung	Vektor	Quelle
pWS4085	<i>pTEF2-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4667	<i>pMET25-yEGFP-CDH1-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4157	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4150	<i>pTEF2-yEGFP-CDH1(245-566)-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4256	<i>pTEF2-CDH1(145-257)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4263	<i>pTEF2-CDH1(1-144)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4407	<i>pTEF2-CDH1(1-100)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4405	<i>pTEF2-CDH1(1-63)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4806	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-NLSm-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4781	<i>pTEF2-CDH1(12-257)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4803	<i>pTEF2-CDH1(21-257)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4446	<i>pTEF2-CDH1(32-257)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung

pWS4149	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-9)A-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4310	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-m(4-9)A-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4309	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-3)A-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4521	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-2)A-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4455	<i>CDH1(bp211-854)-m(4-9)D¹</i>	pEX-A2	diese Arbeit
pWS4456	<i>CDH1(bp211-854)-m(4-9)D²</i>	pEX-A2	diese Arbeit
pWS4476	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-m(4-9)D-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4477	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-3)A-m(4-9)D-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4569	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-3)D-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4721	<i>pMET25-yEGFP-CDH1-m(1-3)A-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4722	<i>pMET25-yEGFP-CDH1-m(4-9)A-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4616	<i>pGALL-HA3-CDH1-tCYC1</i>	pIS375	diese Arbeit
pWS4618	<i>pGALL-HA3-CDH1-m(1-3)A-tCYC1</i>	pIS375	diese Arbeit
pWS4623	<i>pGALL-HA3-CDH1-m(4-9)A-tCYC1</i>	pIS375	diese Arbeit
pWS4628	<i>pGALL-HA3-CDH1-m(1-7)A-tCYC1</i>	pIS375	diese Arbeit
pWS4668	<i>pGALL-HA3-CDH1-m(1-3, 8-9)A-tCYC1</i>	pIS375	diese Arbeit
pWS4619	<i>pGALL-HA3-CDH1-m(1-9)A-tCYC1</i>	pIS375	diese Arbeit
pWS4624	<i>pGALL-HA3-CDH1-m(4-9)D-tCYC1</i>	pIS375	diese Arbeit
pWS4625	<i>pGALL-HA3-CDH1-m(1-3)A-m(4-9)D-tCYC1</i>	pIS375	diese Arbeit
pWS3684	<i>pTEF2-yEGFP-MYC3-CDC20-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4159	<i>pTEF2-yEGFP-CDC20(242-610)-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3612	<i>pTEF2-CDC20(1-248)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS305	Sammlung
pWS4158	<i>pTEF2-CDC20(1-180)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3616	<i>pTEF2-CDC20(1-119)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS305	Sammlung
pWS3614	<i>pTEF2-CDC20(1-80)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS305	Sammlung
pWS2741	<i>pGAL1-MYC3-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3618	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3649	<i>pGAL1-MYC3-cdc20(1-80)rxxl1/2-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3648	<i>pGAL1-MYC3-cdc20(1-80)rxxl2-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3647	<i>pGAL1-MYC3-cdc20(1-80)rxxl1-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4039	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-69)-yEGFP-tCYC1-</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4038	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-50)-yEGFP-tCYC1-</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3984	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(41-80)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3985	<i>pGAL1-MYC3-cdc20(41-80)rxxl2-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4069	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-50)-yEGFP-NLS³-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3930	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-40)-yEGFP-NLS³-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3652	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-NES⁴-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3928	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-NLS³-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3810	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HHO1-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3808	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HTB1-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung

pWS3674	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-80)-yEGFP-HMO1-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3968	<i>pTEF2-cdc20(1-80)-S24A-yEGFP-tCYC1</i>	pRS305	diese Arbeit
pWS3969	<i>pTEF2-cdc20(1-80)-S24D-yEGFP-tCYC1</i>	pRS305	diese Arbeit
pWS3620	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-248)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4174	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-180)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3619	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-119)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3769	<i>pTEF2-cdc20(1-248)rrxl1-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	pRS305	Sammlung
pWS3772	<i>pTEF2-cdc20(1-248)ΔCB-yEGFP-tCYC1-LEU2</i>	pRS305	Sammlung
pWS3466	<i>pCDC20-MYC3-CDC20</i>	YIplac211	Sammlung
pWS3641	<i>pCDC20-MYC3-cdc20rrxl1</i>	YIplac211	diese Arbeit
pWS3642	<i>pCDC20-MYC3-cdc20rrxl2</i>	YIplac211	diese Arbeit
pWS3654	<i>pCDC20-MYC3-cdc20rrxl1/2</i>	YIplac211	diese Arbeit
pWS3467	<i>pCDC20-MYC3-cdc20ΔIR-tCYC1</i>	YIplac211	Sammlung
pWS3655	<i>pCDC20-MYC3-cdc20rrxl1ΔIR-tCYC1</i>	YIplac211	diese Arbeit
pWS3646	<i>pCDC20-MYC3-cdc20rrxl2ΔIR-tCYC1</i>	YIplac211	diese Arbeit
pWS3656	<i>pCDC20-MYC3-cdc20rrxl1/2ΔIR-tCYC1</i>	YIplac211	diese Arbeit
pWS3546	<i>pGAL1-MYC9-CDC20-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3690	<i>pGAL1-MYC9-cdc20rrxl1-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3691	<i>pGAL1-MYC9-cdc20rrxl2-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3692	<i>pGAL1-MYC9-cdc20rrxl1/2-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS3548	<i>pGAL1-MYC9-cdc20ΔIR-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS1226	<i>pCDC20-HA-CDC20</i>	YIplac211	Sammlung
pWS1227	<i>pCDH1-HA3-CDH1</i>	YIplac211	Sammlung
pWS1233	<i>pCDH1-HA3-N1WD20</i>	YIplac211	Sammlung
pWS1232	<i>pCDC20-HA-N20WD1</i>	YIplac211	Sammlung
pWS4140	<i>pCDH1-HA3-N1mpWD20</i>	YIplac211	diese Arbeit
pWS4218	<i>pCDC20-HA-N20WD1mp</i>	YIplac211	diese Arbeit
pWS1146	<i>pCDH1-HA3-CDH1-m11</i>	YIplac211	Sammlung
pWS4520	<i>pSIC1-SIC1-HA3-tADH1</i>	pRS304	diese Arbeit
pWS1236	<i>pCDC20-HA-N20WD1</i>	pRS305	Sammlung
pWS4145	<i>pCDC20-HA-N20WD1</i> Genbank 1 (0,25 mM MnCl ₂)	YCplac33	diese Arbeit
pWS4146	<i>pCDC20-HA-N20WD2</i> Genbank 2 (0,5 mM MnCl ₂)	YCplac33	diese Arbeit
pWS4313	<i>pCDC20-HA-CDC20</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4129	<i>pCDC20-HA-N20WD1</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4576	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M1</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4577	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M3</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4578	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M4</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4579	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M5</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4580	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M9</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4581	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M16</i>	YCplac33	diese Arbeit

pWS4582	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M21</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4583	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M22</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4584	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M23</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4585	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M24</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4586	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M26</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4587	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M27</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4588	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M28</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4589	<i>pCDC20-HA-N20WD1-M29</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4314	<i>pCDC20-HA-N20WD1-T449Q</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4315	<i>pCDC20-HA-N20WD1-Y492N</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS3416	<i>pCDC20-HA-N20WD1-T449Q-Y492N</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4347	<i>pGAL1-MYC3-CDH1(1-257)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4349	<i>pGAL1-MYC3-CDH1(1-257)-m(1-3)A-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4348	<i>pGAL1-MYC3-CDH1(1-257)-m(1-9)A-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3790	<i>pGAL1-MYC3-yEGFP-NLS³-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS3787	<i>pGAL1-MYC3-CDC20(1-40)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4768	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-pNESm-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4807	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-NLSm-yEGFP-NLS³-tCYC1</i>	pRS306	diese Arbeit
pWS4771	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-yEGFP-NLS³-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4769	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-ΔCB-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4770	<i>pTEF2-CDH1(1-257)-m(1-9)A-ΔCB-yEGFP-tCYC1</i>	pRS306	Sammlung
pWS4607	<i>pCDC20-HA-N20WD1-T449I</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4608	<i>pCDC20-HA-N20WD1-R540L</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4575	<i>pCDC20-HA-N20WD1-R540K</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4609	<i>pCDC20-HA-N20WD1-T449Q-R540K</i>	YCplac33	diese Arbeit
pWS4276	<i>pPDS1-PDS1(1-175)-yEGFP-tCYC1</i>	pRS305	diese Arbeit
pWS4379	<i>pPDS1-PDS1(1-175)rxxl-yEGFP-tCYC1</i>	pRS305	diese Arbeit
pWS4367	<i>pPDS1-PDS1(1-175)ken-yEGFP-tCYC1</i>	pRS305	diese Arbeit

Tabelle 8.4: Liste der für die Bestimmung des Paarungstyps verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz und Verwendungszweck
WS826	5'-AGTCACATCAAGATCGTTTATGG-3' Oligonukleotid für die Bestimmung des Paarungstyps (Huxley <i>et al.</i> , 1990)
WS827	5'-GCACGGAATATGGGACTACTTCG-3' Oligonukleotid für die Bestimmung des Paarungstyps, α-spezifisch (Huxley <i>et al.</i> , 1990)
WS828	5'-ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG-3' Oligonukleotid für die Bestimmung des Paarungstyps, a-spezifisch (Huxley <i>et al.</i> , 1990)

Tabelle 8.5: Liste der für die zielgerichtete Mutagenese verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz und Verwendungszweck
WS2786	5'-CCTGAACCCATTCATGAATAATgatCCTTCCTCCgacCCCACTCAAGGGTTCTGAAAG-3' primer für die Mutagenese der Codons 12 und 16 in <i>CDH1</i> zu Aspartat-Codons (Phospho-mimetische Mutation an den Cdk-Phosphorylierungsstellen 1 und 2)
WS2787	5'-CTTTCAGAACCCTTGAGTGGGtcGGAGGAAGGatcATTATTCATGAATGGGTTCAGG-3' primer für die Mutagenese der Codons 12 und 16 von <i>CDH1</i> zu Aspartat-Codons (Phospho-mimetische Mutation an den Cdk-Phosphorylierungsstellen 1 und 2)
WS2897	5'-CACTCAAGGGTTCTGAAAGTgctgcaGTATCGgcAgctCCAATATCTAGTTCTTCGTCC-3' primer für die Mutagenese der Codons 24, 25, 28 und 29 von <i>CDH1</i> zu Alanin-Codons (Mutation des vorderen, basischen Aminosäurebereichs der bipartiten NLS)
WS2898	5'-GGACGAAGAACTAGATATTGGagcTgcCGATActgcagcACTTTCAGAACCCTTGAGTG -3' primer für die Mutagenese der Codons 24, 25, 28 und 29 von <i>CDH1</i> zu Alanin-Codons (Mutation des vorderen, basischen Aminosäurebereichs der bipartiten NLS)
WS2887	5'-TCACTATTATCATCTCCCTCagctgcATCGgcaCCGTCTACAGTATATGGTGA-3' primer für die Mutagenese der Codons 45, 46 und 48 von <i>CDH1</i> zu Alanin-Codons (Mutation des hinteren, basischen Aminosäurebereichs der bipartiten NLS)
WS2888	5'-TCACCATATACTGTAGACGGTgcCGATgcagctGAGGGAGATGATAATAGTGA -3' primer für die Mutagenese der Codons 45, 46 und 48 von <i>CDH1</i> zu Alanin-Codons (Mutation des hinteren, basischen Aminosäurebereichs der bipartiten NLS)
WS2866	5'-AACAGATATAGATTTCAATTCCAgttcTTCctcgAGTAGTATGGCAAGCGTTCC-3' primer für die Mutagenese der Codons 69, 70 und 72 von <i>CDH1</i> zu Serin-Codons (Mutation der putativen NES für Crm1-abhängigen Export)
WS2867	5'-GGAACGCTTGCCATACTACTcgaGGAgaacTGGAATTGAAATCTATATCTGTT-3' primer für die Mutagenese der Codons 69, 70 und 72 von <i>CDH1</i> zu Serin-Codons (Mutation der putativen NES für Crm1-abhängigen Export)
WS2249	5'-ATGCAGCAATTAGCGGTAACgcTagcGTAgcTTCTATTGCGTCCCCAACA-3' primer für die Mutagenese der Codons 17 und 20 von <i>CDC20</i> zu Alanin-Codons (Mutation des RxxL1-Motivs zu AxxA)
WS2250	5'-TGTTGGGACGCAATAGAAgcTACgctAgcGTTACCGCTAATTGCTGCAT-3' primer für die Mutagenese der Codons 17 und 20 von <i>CDC20</i> zu Alanin-Codons (Mutation des RxxL1-Motivs zu AxxA)
WS2251	5'-CTGAACATTAGAACTCCAAAgcTCCCAGcgctCAAGCCTCTGCCAATTCTAT-3' primer für die Mutagenese der Codons 60 und 63 von <i>CDC20</i> zu Alanin-Codons (Mutation des RxxL2-Motivs zu AxxA)
WS2252	5'-ATAGAATTGGCAGAGGCTTGagcgCTGGGAgcTTTGGAGTTTCTAATGTTTCAG-3' primer für die Mutagenese der Codons 60 und 63 von <i>CDC20</i> zu Alanin-Codons (Mutation des RxxL2-Motivs zu AxxA)
WS2459	5'-CCGTTCTGTACTTTCTATTGCagCCCCAACAAAGCTAAACATAC-3' primer für die Mutagenese des Codons 24 von <i>CDC20</i> zu einem Alanin-Codon (Mutation zur Entfernung der putativen Cdk-Phosphorylierungsstelle an Serin-24)
WS2460	5'-GTATGTTTAGCTTTGTTGGGGctGCAATAGAAAGTACAGAACGG-3' primer für die Mutagenese des Codons 24 von <i>CDC20</i> zu einem Alanin-Codon (Mutation zur Entfernung der putativen Cdk-Phosphorylierungsstelle an Serin-24)
WS2461	5'-CGTTCTGTACTTTCTATTGCGgatCCAACAAAGCTAAACATACTATC-3' primer für die Mutagenese des Codons 24 von <i>CDC20</i> zu einem Aspartat-Codon (Phospho-mimetische Mutation der putativen Cdk-Phosphorylierungsstelle an Serin-24)
WS2462	5'-GATAGTATGTTTAGCTTTGTTGGatcCGCAATAGAAAGTACAGAACG-3' primer für die Mutagenese des Codons 24 von <i>CDC20</i> zu einem Aspartat-Codon (Phospho-mimetische Mutation der putativen Cdk-Phosphorylierungsstelle an Serin-24)
WS2639	5'-CTAGCTACCGGTGGTGGTcaAGCAGATAGAAGACTAAAAATC-3' primer für die Mutagenese des Codons 449 von <i>CDH1</i> zu einem Glutamin-Codon

WS2640	5'-GATTTTGTAGTCTTCTATCTGCTgACCACCACCGGTAGCTAG-3' <i>primer für die Mutagenese des Codons 449 von CDH1 zu einem Glutamin-Codon</i>
WS2641	5'-AGCTTGTGACATCACATGGTgACTCAAATATAACTTAACCTTG-3' <i>primer für die Mutagenese des Codons 492 von CDH1 zu einem Asparagin-Codon</i>
WS2642	5'-CAAGGTAAAGTTATATTTTGAGTgACCATGTGATGTCACAAGCT-3' <i>primer für die Mutagenese des Codons 492 von CDH1 zu einem Asparagin-Codon</i>
WS2788	5'-TGGGGCTGGAGATGAAACAcTtaagTATTGGAACTTTTGATAAACC-3' <i>für die Mutagenese des Codons 540 von CDH1 zu einem Lysin-Codon</i>
WS581	5'-CCATGCGCAACAACAAGGAgcATTGCCTgctGCAGCAAAAGACAACAATAG-3' <i>primer für die Mutagenese der Codons 85 und 88 von PDS1 zu Alanin-Codons (Mutation des RxxL-Motivs zu AxxA)</i>
WS582	5'-CTATTGTTGTCTTTTGCTGCagcAGGCAATgcTCCTTGTGTTGCGCATGG-3' <i>primer für die Mutagenese der Codons 85 und 88 von PDS1 zu Alanin-Codons (Mutation des RxxL-Motivs zu AxxA)</i>
WS2682	5'-TGATGCCAGCTAACGAAGATgctGcagcTAATATCGTATATACAGGGAATG-3' <i>primer für die Mutagenese der Codons 8-10 von PDS1 zu Alanin-Codons (Mutation des KEN-Motivs zu AAA; bindet zum Teil in Promotorregion)</i>
WS2683	5'-CATTCCCTGTATATACGATATTAgctgCagcATCTTCGTTAGCTGGCATCA-3' <i>primer für die Mutagenese der Codons 8-10 von PDS1 zu Alanin-Codons (Mutation des KEN-Motivs zu AAA; bindet zum Teil in Promotorregion)</i>

Tabelle 8.6: Liste der für die Bestimmung der Integrationszahl verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz und Verwendungszweck
WS2604	5'-GAAACAGCTATGACCATGATTAC-3' Oligonukleotid P1 für den Nachweis der Integration eines Ylplac-Plasmids
WS2605	5'-GCTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3' Oligonukleotid P2 für den Nachweis der Integration eines Ylplac-Plasmids
WS2606	5'-GCACTCTCAGTACAATCTGCTC-3' Oligonukleotid P3 für den Nachweis der multiplen Integration eines Ylplac-Plasmids
WS2607	5'-CGGAAATGTTGAATACTCATACTC-3' Oligonukleotid P4 für den Nachweis der multiplen Integration eines Ylplac-Plasmids

Tabelle 8.7: Liste der für die Zufallsmutagenese verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz und Verwendungszweck
WS2519	5'-TGATTTAATTAAATTAAGGAAAATC-3' <i>forward primer zur Amplifikation der WD40-codierenden Region von N20WD1 (bindet ab Basenpaar 711 von CDC20)</i>
WS2520	5'-TTACTCGAGGTCGACTCTAG-3' <i>reverse primer zur Amplifikation der WD40-codierenden Region von N20WD1 (bindet in pRS305)</i>

Tabelle 8.8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienmedien

Für die Herstellung von LB-Agar-Medium wurde dem LB-Flüssigmedium 1,7% (w/v) Euroagar zugegeben. Um auf die Aufnahme von Plasmiden, die eine Ampicillinresistenz vermitteln, zu selektieren, wurde das LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt.

Medium	Zusammensetzung	
LB-Flüssigmedium	Bacto Trypton (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA) Bacto Yeast Extract (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA) Natriumchlorid	10 g/l 5 g/l 10 g/l
SOC-Flüssigmedium	Bacto Trypton (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA) Bacto Yeast Extract (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA) Natriumchlorid Kaliumchlorid Magnesiumchlorid Glukose	20 g/l 5 g/l 10 mM 2,5 mM 10 mM 20 mM
TB-Flüssigmedium	Bacto Trypton (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA) Bacto Yeast Extract (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA) Glycerin nach Autoklavieren: Kaliumdihydrogenphosphat Dikaliumhydrogenphosphat	12 g/l 24 g/l 4 ml/l 17 mM 72 mM

Tabelle 8.9: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Hefemedien

Für die Herstellung von festen Medien wurde dem Medium 1,7% (w/v) Bacto Agar (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA) zugegeben. Dem Selektivmedien wurde je nach zu testendem Auxotrophie-Marker der Stämme Adenin (50 mg/l), Histidin (50 mg/l), Leucin (100 mg/l), Tryptophan (100 mg/l) oder Uracil (50 mg/l) zugesetzt. Zur Selektion auf Resistenzen von Toxinen wurde G418 in der Konzentration von 500 µg/ml verwendet.

Medium	Zusammensetzung	
Vollmedium (XY)	Bacto Pepton (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA) Bacto Yeast Extract (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA) Tryptophan Adeninsulfat Kaliumdihydrogenphosphat Zucker	20 g/l 10 g/l 0,2 g/l 0,1 g/l 10 mM 20 g/l
Selektivmedium	YNB (10x; Tabelle 8.10) Dropout -5 (10x; Tabelle 8.10) Glukose	100 ml/l 100 ml/l 20 mM
Selektivmedium ohne Methionin (SD-Met)	YNB (10x; Tabelle 8.10) Dropout -6 (10x; Tabelle 8.10) Glukose	100 ml/l 100 ml/l 20 mM
Selektivmedium ohne Methionin und ohne Cystein	YNB (10x; Tabelle 8.10) CSM-7 (10x; Tabelle 8.10) Lysin Glukose	100 ml/l 100 ml/l 50 mg/l 20 mM
Synthetisches Medium mit 5-Fluorouracil	YNB (10x; Tabelle 8.10) Dropout ++ (10x; Tabelle 8.10) Glukose 5-Fluorouracil (Zymo Research, Irvine, CA, USA); gelöst in DMSO	100 ml/l 100 ml/l 20 mM 1 mg/l

Prä-Sporulations-Medium	Bacto Pepton (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA)	3 g/l
	Bacto Yeast Extract (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA)	8 g/l
	Adeninsulfat	50 mg/l
	Glukose	100 g/l
Sporulations-Medium	Bacto Yeast Extract (BD Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA)	1 g/l
	Dropout ++ (10x; Tabelle 8.10)	10 ml/l
	Kaliumacetat	10 g/l
	Glukose	0,5 g/l

Tabelle 8.10: Liste der für die Herstellung von Medien verwendeten Lösungen

Die Dropout-5- und Dropout-6-Lösung entspricht in der Zusammensetzung der Dropout++-Lösung, außer dass die in Klammern gesetzten Aminosäuren und Nukleinsäuren fehlen.

Lösung	Zusammensetzung	
Dropout ++ (10x) sowie [Dropout -5] und {Dropout -6}	{[Adenin]}	0,5 g/l
	Alanin	0,5 g/l
	Arginin	0,5 g/l
	Asparagin	0,5 g/l
	Aspartat	1 g/l
	Cystein	0,5 g/l
	Glutamin	0,5 g/l
	Glutamat	1 g /l
	Glycin	0,5 g/l
	{[Histidin]}	0,5 g/l
	(myo-)Inositol	0,5 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	{[Leucin]}	1 g/l
	Lysin	0,5 g/l
	{[Methionin]}	0,5 g/l
	p-Aminobenzoesäure	50 mg/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Prolin	0,5 g/l
	Serin	1 g/l
	Threonin	1 g/l
	{[Tryptophan]}	1 g/l
	Tyrosin	0,5 g/l
	{[Uracil]}	0,5 g/l
	Valin	1 g/l
CSM-7 (10x)	Arginin	0,5 g/l
	Aspartat	0,8 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Threonin	1,0 g/l
	Tyrosin	0,5 g/l
	Valin	1,4 g/l
YNB (10x)	Yeast Nitrogen Base	17 g/l
	Ammoniumsulfat	50 g/l

9 VERZEICHNISSE

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Zellteilungszyklus von <i>S. cerevisiae</i>	14
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems	22
Abbildung 3.3: Elektronenmikroskopie-Rekonstruktionen von humanem APC/C.....	26
Abbildung 3.4: Bindung der D- und der KEN-Box durch die WD40-Domäne der APC/C-Aktivatoren ..	29
Abbildung 4.1: Lokalisation von Cdh1 Derivaten im Zellteilungszyklus	42
Abbildung 4.2: Nukleo-zytoplasmatischer Transport von Cdh1(1-257)-GFP im Zellteilungszyklus	45
Abbildung 4.3: Regionen für nukleo-zytoplasmatischen Transport in der NTD von Cdh1.....	48
Abbildung 4.4: Identifizierung der NLS in der NTD von Cdh1	51
Abbildung 4.5: Nukleo-zytoplasmatischer Transport von Cdh1(1-257)-GFP nach Entfernung von Cdk- Phosphorylierungsstellen	54
Abbildung 4.6: Nukleo-zytoplasmatischer Transport von Cdh1(1-257)-GFP bei Imitierung dauerhafter Cdk-Phosphorylierung	56
Abbildung 4.7: Quantitativer Vergleich des nukleo-zytoplasmatischen Transports von Cdh1(1-257)- GFP-Derivaten mit Mutationen in Cdk-Phosphorylierungsstellen	57
Abbildung 4.8: APC/C-Interaktion und Lokalisation von Cdh1-Derivaten in Nocodazol-arretierten Zellen	62
Abbildung 4.9: APC/C-Interaktion von Cdh1-Derivaten in Nocodazol-arretierten Zellen bei Co- Expression eines stabilisierten <i>CLB2-Δdb</i> -Konstrukts	65
Abbildung 4.10: APC/C-Interaktion von Cdh1 in asynchron wachsenden Zellen bei Imitierung dauerhafter Phosphorylierung an den Cdk-Motiven 4-9	67
Abbildung 4.11: Lokalisation und Stabilität von Cdc20 und verkürzten Derivaten im Zellteilungszyklus	72
Abbildung 4.12: Fluktuation von Cdc20(1-80)-GFP im Zellteilungszyklus	73
Abbildung 4.13: Rolle von Cdh1 für die Fluktuation von Cdc20(1-80)-GFP im Zellteilungszyklus	74
Abbildung 4.14: Bedeutung der RxxL-Motive des Cdc20(1-80)-Degrons für die Instabilität in der G1- Phase	76
Abbildung 4.15: Notwendige Sequenzelemente des Cdc20(1-80)-Degrons für die Instabilität in der G1-Phase.....	80
Abbildung 4.16: Einfluss der subzellulären Lokalisation auf die Instabilität des Cdc20(1-80)-Degrons in der G1-Phase	83
Abbildung 4.17: Rolle der putativen Cdk-Phosphorylierungsstelle Serin-24 für die Instabilität des Cdc20(1-80)-Degrons.....	87

Abbildung 4.18: Zellwachstum nach Überexpression verschiedener NTD-Derivate von Cdc20	91
Abbildung 4.19: Stabilität von APC/C-Substraten nach Überexpression von <i>CDC20(1-248)-GFP</i>	93
Abbildung 4.20: Zellwachstum nach Überexpression von <i>CDC20(1-248)-GFP</i> in <i>cdh1Δ</i> -Zellen	95
Abbildung 4.21: Zellwachstum nach Überexpression von mutierten <i>CDC20(1-248)-GFP</i> -Derivaten...	96
Abbildung 4.22: Komplementation von <i>cdc20Δ</i> durch <i>cdc20rxxl</i> -Derivate	100
Abbildung 4.23: Zellwachstum und DNA-Profil nach Komplementation von <i>cdc20Δ</i> durch <i>cdc20rxxl</i> -Derivate	101
Abbildung 4.24: Stabilität von APC/C-Substraten nach Überexpression von <i>cdc20rxxl</i> und <i>cdc20ΔIR</i> -Derivaten.....	103
Abbildung 4.25: Schematische Darstellung der Chimären aus Cdc20 und Cdh1	106
Abbildung 4.26: Komplementation von <i>cdc20</i> durch Cdc20, Cdh1 und Aktivator-Chimären	108
Abbildung 4.27: Zellzyklusprogression von <i>CDC20</i> - und <i>N1mpWD20</i> -Zellen	111
Abbildung 4.28: Zellzyklusprogression von Nocodazol-arretierten <i>CDC20</i> - und <i>N1mpWD20</i> -Zellen	115
Abbildung 4.29: Mutationen in der WD40-Domäne von N20WD1, die ein Wachstum in Abwesenheit von Cdc20 und Clb5 ermöglichen (WD40-Spezifitäts-Screen)	118
Abbildung 4.30: Rolle der Aminosäuren T449 und Y492 für die Spezifität von N20WD1	120
Abbildung 4.31: Übernahme der Cdc20-Funktion durch N20WD1-Mutanten bei Anwesenheit von Clb5.....	121
Abbildung 5.1: Sequenz der N-terminalen 65 Aminosäuren von Cdh1	125
Abbildung 5.2: Regulation von APC/C-Interaktionsmotiven in Cdh1 durch Cdk-Phosphorylierungsstellen 4-9.....	130
Abbildung 5.3: Vergleich der Degron-Elemente von Cdh1-Substraten und der CIR von Acm1.....	133
Abbildung 5.4: Position der im WD40-Spezifitäts-Screen identifizierten Aminosäuren in der WD40-Domäne von Cdh1.....	145
Abbildung 6.1: Unterscheidung einer Einfach- von einer Mehrfachintegration eines Plasmids in das Hefegenom mittels PCR	150
Abbildung 8.1: Sequenzvergleich von APC/C-Aktivatoren aus verschiedenen Spezies	191
Abbildung 8.2: Expressionslevel der GFP-Cdh1-Fusionskonstrukte und ihr Einfluss auf das Zellwachstum	193
Abbildung 8.3: Lokalisation von Cdc23-GFP	194
Abbildung 8.4: Interaktion von APC/C und Cdh1 in CoIP-Experimenten nach Co-Expression und getrennter Expression	195
Abbildung 8.5: APC/C-Interaktion von Cdh1-Derivaten in voller Länge und von verkürzten Cdh1(1-257)-GFP-Fusionen	196
Abbildung 8.6: Stabilität von Cdc20(1-80)-GFP vor der Anaphase in <i>CDH1</i> - und <i>cdh1Δ</i> -Zellen	196

Abbildung 8.7: Vergleich der Expressionslevel der Cdc20-Degron-Konstrukte	197
Abbildung 8.8: Vergleich der Expressionslevel von GFP und Cdc20(1-80)-GFP in asynchron wachsenden und G1-arretierten Zellen	197
Abbildung 8.9: Stabilität von GFP+NLS und Cdc20(1-40)-GFP in der G1-Phase	198
Abbildung 8.10: Co-Lokalisation der Histon- und Hmo1-Fusionen des Cdc20-Degrone mit dem Nukleoplasma	198
Abbildung 8.11: Vergleich der Degradation von Cdc20(1-80)-GFP in Mutter- und Tochterzellen	199
Abbildung 8.12: Komplementation von <i>cdc20Δ</i> durch <i>cdc20rxl1/2</i> und <i>cdc20rxl1/2ΔIR</i>	199
Abbildung 8.13: Überprüfung der Integrationszahl der Aktivorkonstrukte in den Komplementationsstämmen aus Abbildung 4.26 und 8.14	200
Abbildung 8.14: Komplementation von <i>cdc20Δ</i> durch hohe Mengen der Aktivator-Derivate	201
Abbildung 8.15: Rolle einer putativen Exportsequenz für Crm1 für den nukleozytoplasmatischen Transport von Cdh1(1-257)-GFP	202
Abbildung 8.16: Einfluss der NLS-Mutation auf den Kernexport von Cdh1(1-257)-GFP	203
Abbildung 8.17: Rolle der C-Box für den nukleozytoplasmatischen Transport von Cdh1(1-257)-GFP	204
Abbildung 8.18: Lage der Mutation in N20WD1-M1	205
Abbildung 8.19: Lage der Mutation in N20WD1-M3	205
Abbildung 8.20: Lage der Mutationen in N20WD1-M21	206
Abbildung 8.21: Lage der Mutationen in N20WD1-M22	206
Abbildung 8.22: Lage der Mutationen in N20WD1-M23	207
Abbildung 8.23: Lage der Mutationen in N20WD1-M26	207
Abbildung 8.24: Lage der Mutationen in N20WD1-M29	208
Abbildung 8.25: Einfluss von Acm1 auf die Übernahme der Cdc20-Funktion durch N20WD1	209
Abbildung 8.26: Fluktuation von Pds1(1-175)-GFP im Zellzyklus	210
Abbildung 8.27: Rolle des KEN- und des Rxyl-Motivs für die Instabilität von Pds1(1-175)-GFP	211

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 6.1: Liste der verwendeten primären Antikörper und Antiseren für die Westernblot-Analyse	168
Tabelle 6.2: Liste der verwendeten sekundären Antikörper für die Westernblot-Analyse	168
Tabelle 8.1: Liste der im WD40-Spezifitäts-Screen identifizierten N20WD1-Mutanten	213
Tabelle 8.2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme	214
Tabelle 8.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.....	220
Tabelle 8.4: Liste der für die Bestimmung des Paarungstyps verwendeten Oligonukleotide	223
Tabelle 8.5: Liste der für die zielgerichtete Mutagenese verwendeten Oligonukleotide.....	224
Tabelle 8.6: Liste der für die Bestimmung der Integrationzahl verwendete Oligonukleotide.....	225
Tabelle 8.7: Liste der für die Zufallsmutagenese verwendeten Oligonukleotide	225
Tabelle 8.8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienmedien	226
Tabelle 8.9: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Hefemedien	226
Tabelle 8.10: Liste der für die Herstellung von Medien verwendeten Lösungen	227

9.3 Abkürzungsverzeichnis

1C	einfacher DNA-Gehalt (vor Replikation der DNA)
2C	doppelter DNA-Gehalt (nach Replikation der DNA)
α -	alpha oder anti
Δ	Deletion
Δ IR	Deletion des IR-Motivs
Δ CB	Deletion der C-Box
Δ db	Deletion der D-Box
μ	Mikro- (10^{-6})
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
Ω	Ohm
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
A	Ampere
AMP	Adenosinmonophosphat
APC/C	<i>anaphase promoting complex/cyclosome</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase (englisch <i>cyclin-dependent kinase</i>)

C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette
CTD	carboxyterminale Domäne
D	Glukose
D-Box	<i>destruction box</i>
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast (englisch: <i>differential interference contrast</i>)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (latein: <i>et altera</i>)
EtOH	Ethanol
FEAR	<i>Cdc fourteen early anaphase release</i>
g	Gramm
<i>g</i>	mittlere Erdschwerebeschleunigung
G	Galaktose
GFP	grünes Fluoreszenzprotein
h	Stunde, (englisch: <i>hour</i>)
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin-Epitop
k	Kilo (10 ³)
l	Liter
LB	<i>Luria Broth</i> , Bakterienmedium
M	Molar oder Mega (10 ⁶)
m	Milli- (10 ⁻³), ohne Zusatz: Meter
MCC	<i>mitotic checkpoint complex</i>
MEN	<i>mitotic exit network</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Myc	c-Myc-Epitop
n	Nano- (10 ⁻⁹)
NES	Kernexportsignal (englisch: <i>nuclear export signal</i>)
NLS	Kernlokalisationssequenz (englisch: <i>nuclear localization sequence</i>)
nm	Nanometer
Noc	Nocodazol
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Ende einer Polypeptidkette
NTD	aminoternale Domäne
OD ₅₉₅	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offener Leserahmen (englisch: <i>open reading frame</i>)

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	<i>proteasome-cyclosome</i> (Strukturmotiv in Proteinen)
PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
R	Raffinose
RFP	rotes Fluoreszenzprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROI	<i>region of interest</i>
s	Sekunde
SAC	Spindelkontrollsystem (englisch: <i>spindle assembly checkpoint</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF	SCF-Komplex (Ubiquitin-Ligase aus Skip1, Cullin und F-Box-Protein)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SPK	Spindelpolkörper
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i> (Strukturmotiv in Proteinen)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymmenge)
Ub	Ubiquitin
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
WD40	WD40-repeat (Strukturmotiv in Proteinen)
w/v	Masse pro Volumen (englisch <i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp
XY	XY-Vollmedium
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren werden nach den internationalen Regeln abgekürzt. Die Schreibweise der Gene und Proteine richtet sich nach der Hefenomenklatur. Gängige Fachbegriffe, für die kein Synonym im Deutschen existiert, wurden aus dem Englischen übernommene und sind *kursiv* dargestellt.

10 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 27.06.1986
Geburtsort: Aachen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Anschrift: Bäcker gasse 35
93059 Regensburg

Akademischer Werdegang und Schulbildung:

Seit 09/2011 Universität Regensburg
Promotion am Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie
Dissertationsthema: "Aktivatoren der Ubiquitin-Ligase APC/C:
Mechanismen und Regulation im Zellteilungszyklus von *S. cerevisiae*"
Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Seufert
Forschungsstipendium des Elitenetzwerk Bayern (06/2012 – 05/2014)

10/2009 – 08/2011 Universität Regensburg
Master of Science (M.Sc.) in Biologie (1,0)

10/2006 – 08/2009 Universität Regensburg
Bachelor of Science (B.Sc.) in Biologie (1,4)

09/1996 – 06/2005 Gymnasium Donauwörth
Allgemeine Hochschulreife

Publikationen:

Höckner S., Neumann-Arnold L., Seufert W. (2016). Dual control by Cdk1 phosphorylation of the budding yeast APC/C ubiquitin ligase activator Cdh1. *Mol Biol Cell*, 10.1091/mbc.E15-11-0787.

Arnold L.*, **Höckner S.***, Seufert W. (2015). Insights into the cellular mechanism of the yeast ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 from the analysis of in vivo degrons. *Mol Biol Cell* 26, 843-858. (* Gleichberechtigte Erstautoren)

11 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Seufert für die außerordentliche Betreuung und die ansteckende Begeisterung für das Thema meiner Arbeit. Herzlichen Dank für die langen, wissenschaftlichen Diskussionen und motivierenden Gespräche sowie die Unterstützung bei der Publikation meiner Daten!

Meinen Mentoren Prof. Dr. Frank Sprenger und Dr. Wolfgang Zachariae danke ich für die kritischen Anmerkungen und hilfreichen Kommentare im Rahmen der Arbeitsberichte, welche zu einem guten Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Speziell Prof. Dr. Frank Sprenger möchte ich für die Hilfestellung bei der Mikroskopie sowie bei der Auswertung der Daten mit ImageJ danken.

Prof. Dr. Herbert Tschochner möchte ich herzlich für die Begutachtung meiner Arbeit danken. Auch den übrigen Mitgliedern der Prüfungskommission, Prof. Dr. Frank Sprenger, Prof. Dr. Stephan Schneuwly und PD Dr. Joachim Griesenbeck, möchte ich an dieser Stelle danken.

Dem Elitenetzwerk Bayern danke ich für die ideelle und finanzielle Förderung im Rahmen eines Forschungsstipendiums.

Außerdem möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Genetik recht herzlich für die tolle Zeit im Labor bedanken. Vor allem meinen Mitstreitern Lea Arnold, Britta Swoboda, Katharina Hannig, Philipp Girke, Nina Weber, Christoph Morgenthaler und Martina Frank danke ich für die schönen Jahre sowie die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den verschiedensten Problemen des Laboralltags. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Wolfgang Mages sowie bei Antje Machetanz-Morokane, Adelheid Weißgerber und Andrea Brücher für die technischen Hilfestellungen und die angenehme Zusammenarbeit bedanken. Ein weiteres Dankeschön geht an Lea, Britta, Kathi und Christoph für die schöne Zeit auch außerhalb des Labors, auf dem Rad und beim Eishockey oder Fußball schauen.

Bei Lea möchte ich mich an dieser Stelle noch einmal ganz besonders für die gute Zusammenarbeit bei der Publikation unserer Daten und vor allem für die Hilfe bei der Revision für die zweite Publikation bedanken. Vielen Dank auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die Unterstützung im Endspurt!

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre aufmunternden Worte und Rücksichtnahme in der Endphase dieser Arbeit bedanken. Meiner Freundin Miriam danke ich von ganzem Herzen für ihren Zuspruch, ihre Unterstützung, für das Korrekturlesen der Arbeit und dass sie mir im Endspurt den Rücken frei gehalten hat.